

# **Untersuchungen zur Stabilität exprimierender S/MAR-MiniCircles für die industrielle Anwendung in Zelllinien**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Markus Andree Heine

aus Braunschweig

1. Referent: apl. Professor Dr. Jürgen Bode

2. Referent: Professor Dr. Stefan Dübel

eingereicht am: 12.12.2011

mündliche Prüfung (Disputation) am: 09.03.2012

Druckjahr 2012

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen, vorab veröffentlicht:

## **Publikationen**

Nehlsen K, Broll S, Kandimalla R, Heinz N, Binius S, Heine M, Oumard A, Schambach A, Bode J. 2011. Replicating Minicircles: Overcoming the Limitations of Transient and Stable Expression Systems. In “Minicircle and Plasmid DNA Vectors – The Future of non-viral and viral Gene-Transfer”. Schleef (Ed.) Wiley-VCH Verlag. In Druck.

## **Patente**

Rehberger B, Heine M, Wodarczyk C, Wagner R. 2010. Verfahren zur semi-synthetischen Herstellung hochreiner Minicircle DNA-Vektoren aus Plasmiden. Patent EP10186568.1.

## **Tagungsbeiträge**

Heine M, Wirth M, Rehberger B, Wodarczyk C, Bode J, Wagner R. 2010. High performance minicircle for industrial production of recombinant therapeutic agents. Tagungsbeitrag. ACTIP-Meeting, 26.05.2010 - 28.05.2010, Alicante.

Heine M, Rehberger B, Wodarczyk C, Wirth M, Bode J, Wagner R. 2011. Simplify your ‚Minicircle‘ production: A semi-synthetic process for manufacturing minicircles. 22. ESACT-Meeting, 15.05.2011 – 18.05.2011, Wien.

Rehberger B, Heine M, Wodarczyk C, Wirth M, Bode J, Wagner R. 2011. ‚Minicircles‘ – New horizons for stable, recombinant gene expression. 22. ESACT-Meeting, 15.05.2011 – 18.05.2011, Wien.

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Seite</b>
<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>2</b>
2.1. Das Chromatin im Zellkern	2
2.1.1. „ <i>Scaffold/Matrix Attachment Regions</i> “ (S/MARs)	6
2.1.2. Der epigenetische Code	8
2.1.3. DNA-Reparaturmechanismen bei Doppelstrangbrüchen	10
2.2. Strategien zur Expression von Transgenen in Mammaliazellen	14
2.2.1. Modifikation und Integration von Fremd-DNA	15
2.2.2. Extrachromosomal replizierende Vektorsysteme	17
2.2.3. Minicircle-DNA	20
2.3. Die Expression von rekombinanten IgG in Mammaliazellen	21
2.4. Aufgabenstellung	23
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>24</b>
3.1. Validierung und Verbesserung des Zwei-Minicircle-Systems zur Produktion von rekombinanten Antikörpern	24
3.1.1. Produktion des rekombinanten Antikörpers Trastuzumab (Herceptin®) in adhärenenten CHO-K1-Zellen	26
3.1.2. Steigerung der Expression durch Austausch der Promotoren und Deletion von Vektorsequenzen	30
3.1.3. Steigerung der Expression durch die Agenzien Natriumbutytrat, Valproat und AzaC	45
3.1.4. Herstellung des rekombinanten Antikörpers Trastuzumab (Herceptin®) in CHO-K1-Suspensionszellen	48
3.2. Optimierung und Entwicklung von Verfahren zur Minicircle-DNA-Gewinnung	50
3.2.1. Generierung durch Rekombination im <i>E. coli</i> -Stamm MM294, EL250 und TopTen FLPE	51
3.2.2. Generierung <i>in vitro</i>	56

---

	<b>Seite</b>
3.3. Stabilität, Etablierung und Expressionsverhalten der Minicircle-DNA in CHO-K1-Suspensionszellen	70
3.3.1. Expressionsverhalten und Stabilität von CHO-K1-Einzelklonen mit Minicircle-DNA	71
3.3.2. Methylierungsstudien mit Minicircle-DNA in CHO-K1-Zellen	81
3.3.3. Mögliche Inhibierung der DNA-Integration	85
3.3.4. Etablierung von Minicircles in CAP-Zellen	89
3.3.5. Sequenzanalyse des SAR E und SAR M18	92
<b>4. Diskussion</b>	<b>95</b>
4.1. Das Zwei-Minicircle-System zur Produktion von rekombinanten Antikörpern	96
4.1.1. Die Produktion von IgG-Molekülen ist mit nur einem Screeningmarker möglich	96
4.1.2. Steigerung der IgG-Produktion durch Verwendung des hUbc-Promotors	97
4.1.3. Es besteht eine gewisse Korrelation zwischen der EGFP- und der IgG-Expression	98
4.2. Etablierung der Minicircle im Zellkern	100
4.2.1. Minicircles werden episomal etabliert	100
4.2.2. Minicircles integrieren zusätzlich zur episomalen Etablierung in das Wirtsgenom	101
4.2.3. Die durch Minicircles vermittelte Expression ist instabil	105
4.3. Die durch SAR M18-Minicircles vermittelte Expression unterliegt epigenetischen Modifikationen	107
4.3.1. Die Histonacetylierung hat Auswirkungen auf die durch Minicircles vermittelte Expression	107
4.3.2. Minicircles können teilweise methyliert werden	108
4.4. Ansätze zur Verbesserung der episomalen Etablierung der Minicircles und der Stabilität der Expression	110
4.4.1. Durch die Optimierung der Minicircle-Sequenz und durch Verwendung eines hUbc-Promotors kommt es zu einer höheren Expression	110
4.4.2. Möglichkeit zur Inhibierung der Doppelstrangreparatur	112

---

	<b>Seite</b>
4.4.3. Durch die Transfektion mit Polyethylenimin (PEI) und die Verwendung von humanen Zellen könnten illegitime Integrationen verhindert werden	116
4.4.4. Reduzierung von illegitimer DNA-Integration durch alternative Selektionsmethoden	118
4.5. Qualitative und quantitative Verbesserung der Generierung von Minicircle-DNA	119
4.5.1. Erhöhung der Ausbeute an Minicircle-DNA in <i>E. coli</i> EL250	119
4.5.2. Die „ <i>in vitro</i> “-Generierung von ccc-Minicircles erfordert keine zusätzlichen Sequenzen und ergibt hochreine ccc-Minicircle-DNA	121
4.5.3. Durch die DNA-Gyrase können nur zirkuläre DNA-Moleküle negativ verdrillt und unterschiedliche Topoisomerverteilungen erreicht werden	124
4.5.4. Stark-negativ verdrillte Minicircle-DNA vermittelt in CHO-K1-Zellen die stabilste Expression nach der Transfektion	125
4.6. Fazit und Ausblick	128
4.6.1. Korrelation der Expression des „ <i>gene of duty</i> “ und des „ <i>gene of interest</i> “	129
4.6.2. Verwendung von anderen S/MAR-Elementen	129
4.6.3. Verbesserung der „ <i>in vitro</i> “-Minicircle-Herstellung	130
<b>5. Material und Methoden</b>	<b>131</b>
5.1. Geräte	131
5.2. Materialien	134
5.2.1. Transferfolien und Filterpapiere	134
5.2.2. Chemikalien	134
5.2.3. Enzyme	134
5.2.4. Zellkulturmaterial	134
5.2.5. Antikörper	135
5.2.6. Vektoren	135
5.2.7. Oligonukleotide	138
5.2.8. Computerprogramme	139
5.2.9. Verwendete Formeln	139

---

	<b>Seite</b>
5.3. Allgemeine Grundtechniken	140
5.3.1. Sterilisieren	140
5.3.2. Fällung von Nukleinsäuren	140
5.3.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	140
5.4. Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> )	140
5.4.1. Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme	140
5.4.2. Verwendete Kulturmedien für Bakterien	141
5.4.3. Kultivierung von <i>E. coli</i>	141
5.4.4. Herstellung von Agarplatten	142
5.4.5. Elektrotransformation von kompetenten Zellen	142
5.4.6. Selektion von Einzelklonen nach der Plasmid-Klonierung und Transformation in <i>E. coli</i>	142
5.4.7. Konservierung von Bakterienkolonien	143
5.5. Isolierung von Nukleinsäuren	143
5.5.1. Isolierung aus prokaryontischen Zellen	143
5.5.1.1. Plasmidisolierung im analytischen Maßstab mit der „Boiling Prep“-Methode	143
5.5.1.2. Plasmidpräparation mit kommerziellen Aufreinigungspacketen der Firma QIAGEN	144
5.5.2. Isolierung aus eukaryotischen Zellen	144
5.5.2.1. Präparation von hochmolekularer DNA mit dem kommerziellen Aufreinigungs-packet „DNeasy Blood & Tissue Kit“ der Firma QIAGEN	144
5.5.2.2. Isolierung von hochmolekularer DNA nach Ramirez-Solis et al. (1995)	145
5.6. DNA-Modifizierung	145
5.6.1. Restriktion von DNA mit Restriktionsendonucleasen	145
5.6.2. Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden	146
5.6.3. Dephosphorylierung der 5'- bzw. 3'-DNA-Enden	146
5.6.4. Ligation von DNA-Fragmenten zur Klonierung von Vektoren	147
5.7. Charakterisierung von Nukleinsäuren	147

---

	<b>Seite</b>
5.7.1. Standard-Polymerasekettenreaktion („ <i>polymerase chain reaction</i> “; PCR)	147
5.7.2. Inverse PCR	148
5.7.3. Southern Blot	150
5.7.4. Agarose-Gelelektrophorese	151
5.7.5. Chloroquin-Agarose-Gelelektrophorese	151
5.7.6. DNA-Rückgewinnung aus Agarosegelen oder enzymatischen Reaktionsansätzen mit dem kommerziellen Aufreinigungspaket „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Firma QIAGEN	153
5.8. Arbeiten mit eukaryontischen Zellen	154
5.8.1. Adhärenente Zellen	154
5.8.1.1. Verwendete Zelllinie	154
5.8.1.2. Kulturnährmedien und Lösungen	154
5.8.1.3. Herstellung von konditioniertem Kulturnährmedium für adhärenente und Suspensionszellen	154
5.8.1.4. Kultivierung von adhärenenten Zellen	155
5.8.1.5. Passagieren von Zellen	155
5.8.1.6. Langzeitlagerung von Zellen	156
5.8.2. Suspensionszellen	156
5.8.2.1. Verwendete Zelllinien	156
5.8.2.2. Kulturnährmedien	156
5.8.2.3. Kultivierung von Suspensionszellen	156
5.8.2.4. Passagieren von Suspensionszellen	157
5.8.2.5. Langzeitlagerung von Suspensionszellen	157
5.8.3. Transfektionsmethoden	157
5.8.3.1. Transfektionsmethoden für adhärenente CHO-K1-Zellen	157
5.8.3.1.1. Transfektion durch Lipofektion mit „GenePorter 2“ von PEQLAB	157
5.8.3.1.2. Transfektion durch Lipofektion mit „Lipofectamine 2000“ von INVITROGEN	158
5.8.3.2. Transfektionsmethoden für Suspensionszellen	159



---

	<b>Seite</b>
5.8.3.2.1. „Nucleofektion“ mit dem AMAXA-System von LONZA	159
5.8.3.2.2. Elektroporation mit dem NEON <sup>TM</sup> -System von INVITROGEN	159
5.8.3.2.3. Transfektion mit 25 kDa-Polyethylenimin (PEI)	159
5.8.4. Selektion von exprimierenden Zellen	161
5.8.4.1. Selektion durch Puromycin-Resistenz	161
5.8.4.2. Durchflusszytometrie („ <i>Fluorescence-activated cell sorting</i> “, FACS)	161
5.8.4.3. Einzelzellklonierung	161
5.8.5. IgG-Nachweis durch ELISA („ <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> “)	164
5.9. Produktion und Aufreinigung von Minicircle-DNA	166
5.9.1. Vermehrung und Rekombination der DNA in MM294-Flp- <i>E. coli</i> -Zellen	166
5.9.2. Vermehrung und Rekombination der DNA in EL250-Flp- <i>E. coli</i> -Zellen	168
5.9.3. Aufreinigung der Minicircle-DNA aus dem entstehenden Plasmid-Gemisch durch Gelextraktion	168
5.9.4. „ <i>In vitro</i> “-Herstellung von Minicircle-DNA	169
<b>6. Abkürzungen</b>	<b>170</b>
<b>7. Literatur</b>	<b>173</b>
<b>8. Danksagung</b>	<b>197</b>

## 1. Zusammenfassung

Es existieren eine Vielzahl an Verfahren zur Manipulation und Modifikation von Zellen zur Expression von rekombinanten therapeutischen Proteinen. Die dabei verwendeten Vektoren werden in integrierende und nicht-integrierende, episomal vorliegende Vektoren eingeteilt. Extrachromosomale bzw. episomale Vektoren besitzen den Vorteil, dass sie die Funktion und Regulation der Gene im Genom nicht beeinflussen, da es nicht zu einer Insertionsmutagenese oder Zelltransformation kommt.

Der episomal replizierende Vektor pEPI besitzt eine „*scaffold matrix attachment region*“ (S/MAR, SAR E), die durch Wechselwirkungen mit Proteinen der Kernmatrix eine Bindung an diese vermittelt und für die stabile Replikation und Segregation des Vektors während der Zellteilung verantwortlich ist.

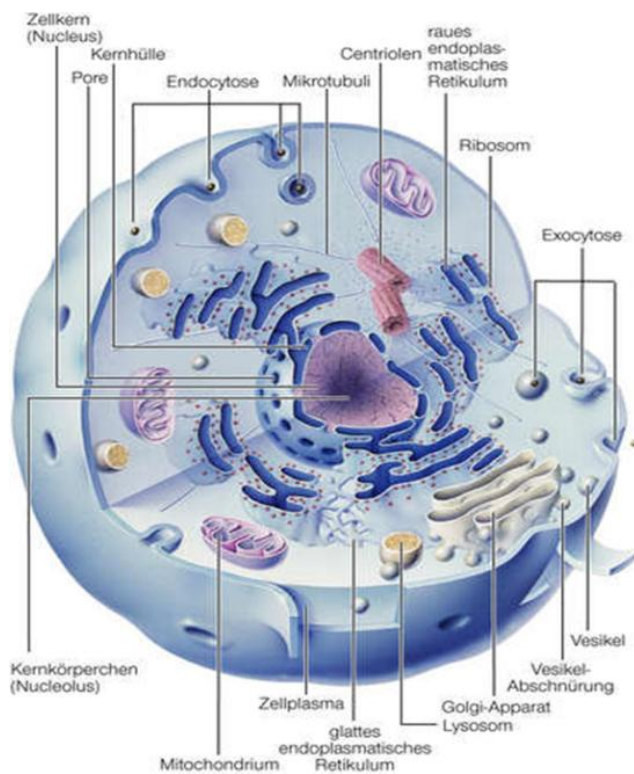
In dieser Arbeit wurde die Verwendung von, auf dem Vektor pEPI basierenden, Minicircles (pEPI-delCM18-Minicycle) zur stabilen Transgenexpression untersucht. Der verwendete Minicycle enthielt ein Größenreduziertes SAR E, das SAR M18. Durch das SAR M18 und die Deletion der prokaryotischen Sequenzen und des Resistenzmarkers sollte eine stabile episomale Etablierung des Minicircles im Zellkern ohne Selektionsdruck möglich sein.

Auf Grundlage des Minicircles pEPI-delCM18 wurde ein stabiles Zwei-Minicycle-Expressionssystem zur Generierung von rekombinanten Antikörpern in CHO-K1-Zellen mit nur einem Screeningmarker (EGFP) und unterschiedlichen Promotoren entwickelt. Es konnte gezeigt werden, dass es überwiegend zu einer episomalen Etablierung der zirkulären Minicircles kommt. Der Minicycle-Transfer führt gerade in CHO-K1-Zellen häufig zu ungerichteten Minicycle-Integrationen in das CHO-Genom und Deletionen innerhalb des Minicircles durch Doppelstrangbrüche. Aufgrund dessen wurde ein Konzept zur Inhibierung der Integration des Minicircles in das Wirtsgenom entwickelt. Darüber hinaus wurde die episomale Etablierung des Minicircles in einer neuen, von humanen Amniozyten abgeleiteten, Zelllinie (CAP) nachgewiesen. Durch Sequenzvergleich des SAR M18 mit dem CHO-K1-Genom konnte gezeigt werden, dass die Gefahr einer Integration über das SAR M18 durch homologe Rekombination gering ist. Es wurde weiterhin ein neues Verfahren zur Generierung von hochreiner Minicycle-DNA entwickelt. Dieses erfordert keine zusätzlichen, z.B. zur Generierung oder Aufreinigung von Minicycle-DNA benötigten, Sequenzen im Ursprungsvektor bzw. Minicycle. Damit ermöglicht es die schnelle und variable Herstellung von Minicircles aus unterschiedlichen Vektoren.

## 2. Einleitung

### 2.1. Das Chromatin im Zellkern

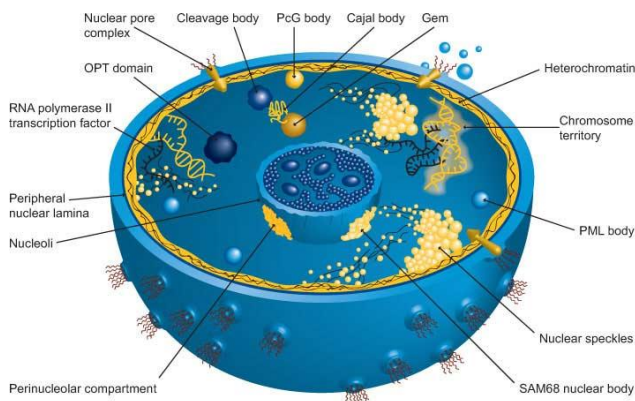
Eukaryotische und prokaryotische Zellen sind von einer Plasmamembran umgeben. Im Gegensatz zu den prokaryotischen Zellen enthalten jedoch die meisten eukaryotischen Zellen auch stark ausgeprägte innere Membranen, die spezifische Kompartimente, die Organellen, umschließen und von dem übrigen Cytoplasma abtrennen. Jeder Organellentyp besitzt bei Wachstum und Metabolismus der Zelle eine spezifische Rolle und enthält eine bestimmte Kombination spezifischer Enzyme, welche die erforderlichen chemischen Reaktionen ausführen.



**Abbildung 1: Die Struktur einer tierischen Zelle.<sup>[1]</sup>**

Das größte Organell in der eukaryotischen Zelle ist im Allgemeinen der Zellkern, der den größten Teil der zellulären DNA enthält. In fast allen eukaryotischen Zellen existieren verschiedene andere Organellen. Die Mitochondrien bewerkstelligen einen Großteil des Energiestoffwechsels der Zelle. Im rauen und glatten endoplasmatischen Retikulum, einem Membrannetzwerk, werden Glykoproteine und Lipide synthetisiert. Durch die Golgi-Vesikel werden Proteine an die Zielorte in der Zelle gebracht. Der Abbau von Fett- und Aminosäuren findet in den Peroxisomen statt. In den Lysosomen werden unbrauchbar gewordenen Zellbausteine und von der Zelle aufgenommenes Material abgebaut. Das Cytoskelett der Zelle besteht aus drei Klassen von Filamenten, den Mikrotubuli, welche Centriolen bilden, den Mikrofilamenten und Intermediärfilamenten. Weiterhin verleiht das Cytoskelett der Zelle Stabilität und Festigkeit und dient der Aufrechterhaltung der Zellform.

Das größte Organell in der eukaryotischen Zelle ist im Allgemeinen der Zellkern, der den größten Teil der zellulären DNA, verteilt auf Chromosomen, enthält. Die Kernhülle besteht aus zwei Lipidmembranen. Die äußere Membran ist ein Bestandteil oder eine Fortsetzung des endoplasmatischen Retikulums (ER). Die innere Membran ist mit einem Netzwerk fadenförmiger Proteinstrukturen verbunden, der Kern-Lamina oder Kern-Matrix („*nuclear scaffold*“), die der Kernhülle ihre Festigkeit verleiht. In der Kernhülle sind Kern-Poren-Komplexe, die aus über 1000 Proteinen aufgebaut sind, eingelagert.



**Abbildung 2: Domänen des Zellkerns** <sup>[2]</sup>

Der Zellkern wird durch zwei Lipidmembranen umschlossen, wobei die äußere Membran in das endoplasmatische Reticulum übergeht. Weiterhin sind in der Lipiddoppelschicht Kernporen eingelagert, durch die Moleküle transportiert werden können. Die Kernmatrix („*Peripheral nuclear lamina*“) besteht aus den Laminen A-C und weiteren regulatorischen und strukturellen Proteinen. Sie dient als Kern-Gerüst und als Bindungsplattform für das Interphase-Chromatin. Das Chromatin ist im Nucleoplasma in Territorien („*Chromosome territories*“) eingeteilt. Diese Territorien weisen eine dynamische Struktur auf. In manchen Zelllinien ist das inaktive Heterochromatin als Band fest an die Kernmatrix gebunden („*Heterochromatin*“). „*PcG bodies*“ bestehen aus Polycomb-Proteinen (z.B. RING1, BMI1), die mit dem pericentromeren Heterochromatin interagieren und dieses in den inaktiven Zustand bringen bzw. im inaktiven Zustand halten. Im Nucleoplasma sind sog. „*nuclear speckles*“ verteilt, die aus Pre-mRNA-Splicing-Faktoren bestehen. In vielen Zelltypen sind die Pre-mRNA-Splicing-Faktoren ebenfalls in „*Cajal bodies*“ lokalisiert. Diese sind an der snRNP-Biogenese und an den Wechselwirkungen von snRNPs und snoRNPs beteiligt. „*Gems*“ (*gemini of Cajal bodies*) kommen überwiegend in der Nähe der *Cajal bodies* vor und sind am Zusammenbau und der Reifung der snRNPs beteiligt. Transkriptionsloci sind im Nucleoplasma verteilt, u.a. auch um die „*nuclear speckles*“ herum. Mehrere Transkriptionsfaktoren können sich auch zu „*OPT domains*“ (Oct1/PTF/Transcription) zusammenlagern. Mehrere Faktoren, die an der Prozessierung der pre-mRNA beteiligt sind, konzentrieren sich ebenfalls in bestimmten Loci, den „*cleavage bodies*“. Der „Nucleolus“ ist der Bereich, in dem die rRNA-Synthese, die rRNA-Prozessierung und der Zusammenbau der Ribosomen-Untereinheiten stattfinden. Das „*Perinuclear compartment*“ und der „*SAM 68 nuclear body*“ sind in den RNA-Metabolismus involviert. Die „*PML bodies*“ spielen bei der Regulation der Transkription eine Rolle und besitzen eine große Bedeutung bei der Replikation von DNA-Viren (z.B. Herpesviren) nach einer Infektion. Regulatorische virale Proteine assoziieren mit den „*PML bodies*“ während der Transkription des viralen Genoms.

Das Innere des Zellkerns wird zum größten Teil von Chromatin gefüllt, einem Komplex aus DNA und Proteinen. Das Chromatin teilt man dabei noch in dicht gepacktes, inaktives

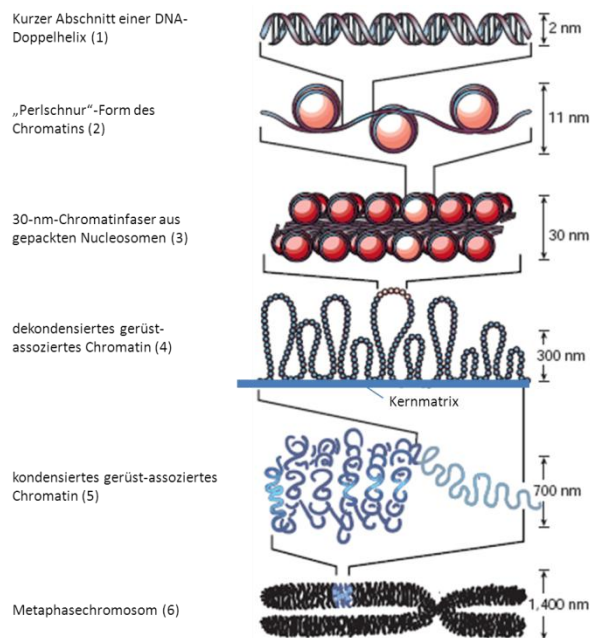
Heterochromatin und locker gepacktes, aktives Euchromatin ein. Der Zellkern ist jedoch in viele weitere abgegrenzte Gebiete unterteilt, in denen spezielle Prozesse (DNA-Replikation, Transkription, RNA-Prozessierung) stattfinden.

Ein relativ großer Bereich, der Nucleolus, bildet sich im Bereich der vielen hintereinander geschalteten rRNA-Gene. Bei der Proliferation der Zellen erfolgt dort eine erhöhte Synthese von rRNA und zugleich auch der Beginn des Ribosomen-Zusammenbaus.

Das Chromatin im Kern liegt in begrenzten Territorien vor. Jedes Territorium umfasst das Chromatin mit der DNA eines Chromosoms. Die Territorien überschneiden sich dabei nicht.<sup>[3]</sup> Zwischen den Territorien liegt jeweils ein DNA-freier Raum, das Inter-Chromatin-Domänen-Kompartiment (ICD-Kompartiment).<sup>[4]</sup> Das ICD-Kompartiment umgibt die Chromosomen-Territorien und dient zum Transport von Makromolekülen und RNA durch den Kern bzw. von den Chromosomen-Territorien zu den Kernporen.<sup>[5]</sup> Es gibt Hinweise für das Vorkommen von aktiven Genen auf der Außenseite und von stummen, nicht-exprimierten Genen im Innern solcher Territorien, d.h. dass sich mit der Aktivierung oder mit der Repression von Genen die Anordnung und die Organisation eines Territoriums ändern kann.<sup>[6]</sup> Untersuchungen haben gezeigt, dass die Kernmatrix, bestehend aus Proteinen (98 %) und heterogener nukleärer RNA (hnRNA), eine molekulare Plattform der DNA-Replikation („*replication factories*“) oder Transkription („*transcription factories*“) darstellt.<sup>[7,8,9]</sup> Die hnRNA hat dabei eine strukturgebende Funktion bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung der Kernmatrix und ist somit an der Organisation des Genoms in Chromosomen-Territorien beteiligt.<sup>[10,11,12]</sup>

Es werden zwei Klassen von chromosomalen Proteinen unterschieden: die mengenmäßig überwiegenden Histone, die für die Verpackung der DNA zuständig sind, und die Nicht-Histon-Proteine, die ein chromosomales Gerüst bilden und für die Organisation von Funktionsdomänen im Chromosom verantwortlich sind. Bei der Verpackung der DNA im Zellkern sind vier Organisationsstufen zu unterscheiden. Die erste Verpackungsstufe besteht in der Ausbildung der Nukleosomen und führt zu einem 10-nm-Faden (Primärstruktur). Auf dieser Stufe wird ein Verkürzungsfaktor des DNA-Doppelstranges von 6-7 erzielt. Ein Nukleosom besteht aus einem bestimmten Abschnitt Kern-DNA (146 bp), der um ein Aggregat aus acht Histon-Proteinen (Core-Histone) gewickelt ist. Diese Core-Histone bezeichnet man als H2A, H2B, H3 und H4, von denen jeweils zwei im Nukleosom vertreten sind. Nukleosomen enthalten weiterhin einen außerhalb der Core-Histone liegenden DNA-Abschnitt (1-80 bp) und ein weiteres Histonmolekül (H1). Chromatin im Zellkern kommt

jedoch hauptsächlich als 30-nm-Faser (Sekundärstruktur) vor. Bei dieser Struktur bilden 6-8 Nukleosomen eine Windung aus und bilden eine Faser von 30 nm Durchmesser. Für den Aufbau der 30-nm-Faser gibt es unterschiedliche Modelle (Solenoid, „superbeads“), jedoch kommt es unabhängig vom Modell zu einem Verkürzungsfaktor von 40.



**Abbildung 3: Organisationsstufen eines eukaryotischen Chromosoms** <sup>[13]</sup>

(1) DNA-Doppelhelix als 2-nm-Faden. (2) Die Anordnung von Core-Histon (Histonoktamer), Histon H1 und der DNA in Nukleosomen im 10-nm-Faden. (3) Bei steigender Ionenstärke in der Lösung bilden die Nukleosomen eine Überstruktur aus (Solenoid). Es ist eine Superhelix mit nur kleinen Unregelmäßigkeiten, bei der das Histon H1 im Innenraum zu liegen kommt. (4) Die Chromatinschleifen werden vom 30-nm-Faden ausgebildet. Sie lagern sich zu mehreren in einer Ebene an (Rosette) und sind in der Mitte über spezifische DNA-Bereiche an ein Proteingerüst gebunden. (5) Die Anordnung mehrerer Rosetten hintereinander führt zu einem 300-nm-Faden und (6) der 300-nm-Faden ist helikal zur Chromatide aufgewunden. In jeder Chromatidenwindung sind etwa 30 Rosetten enthalten. Das Chromosom wird durch zwei Schwesterchromatiden gebildet.

Die 30-nm-Fasern liegen wiederum in Schleifendomänen (Tertiärstruktur) vor, deren Basen an der Kern-Matrix verankert sind. Die Schleifendomänen sind unterschiedlich groß und umfassen im Durchschnitt einen DNA-Bereich von 63 kbp. Sie können eine oder mehrere Transkriptionseinheiten enthalten. Es binden nur bestimmte DNA-Abschnitte an die Kern-Matrix. Diese DNA-Abschnitte nennt man „*scaffold matrix attachment regions*“ (S/MARs). Proteine der Kernmatrix sind z.B. die strukturegebenden Proteine Lamin A-C <sup>[14,15]</sup>, die regulatorischen Proteine DNA-Polymerase  $\alpha$  und  $\beta$  <sup>[16]</sup>, die DNA-Methyltransferase <sup>[17]</sup>, Histon-Deacetylasen <sup>[18]</sup>, Histon-Acetyltransferasen <sup>[19]</sup> und die RNA-Polymerase II. <sup>[20]</sup> Die Proteine SAF-A/hnRNP-U <sup>[21]</sup>, SAF-B <sup>[22]</sup>, SATB1 <sup>[23,24]</sup> und ARBP/MeCP2 <sup>[25]</sup>, die an der RNA-Verpackung, dem „*Splicing*“ oder der DNA-Methylierung beteiligt sind, sind ebenfalls

Bestandteil der Kernmatrix. Die Proteine SATB1, SAF-A, SAF-B und Lamin B1 besitzen die Fähigkeit an S/MARs zu binden und somit die Schlaufenstruktur des Chromatins zu vermitteln.<sup>[26,27,28,29,30]</sup> Das Protein SAF-A kann mit einer Histon-Acetyltransferase interagieren, die durch Acetylierung der Histone den Zugang für Transkriptionsfaktoren an die DNA vermittelt.<sup>[31]</sup> Außerdem ist die Erkennungssequenz bzw. Schnittstelle für die Topoisomerase II („*scaffold I*“, Sc1) in den S/MARs häufig vertreten. Die Topoisomerase II ist das in der Kernmatrix mengenmäßig am häufigsten auftretende Protein.<sup>[32,33]</sup> Die Verknüpfung der DNA mit der Kern-Matrix ist nicht statisch, d.h. dass die Schleifendomänen dynamische Strukturen sind. Es wird davon ausgegangen, dass die Topoisomerase II an diesen Umbauten im Zuge der DNA-Replikation und der Transkription beteiligt ist. Durchschnittlich liegen sechs Schleifendomänen in einer Ebene (Rosette). Es entsteht ein Faden von 200-300 nm Durchmesser. Dadurch wird ein Verkürzungsfaktor von 680 erreicht. Diese 200-300 nm dicken Fäden werden erneut helikal aufgewunden. Jede Windung enthält ungefähr 30 Rosetten. Eine Reihe von Windungen ergibt dann eine Chromatide (Quartärstruktur), und zwei Chromatiden bilden ein Chromosom. Dadurch wird ein gesamter Verkürzungsfaktor von 12000 erreicht.

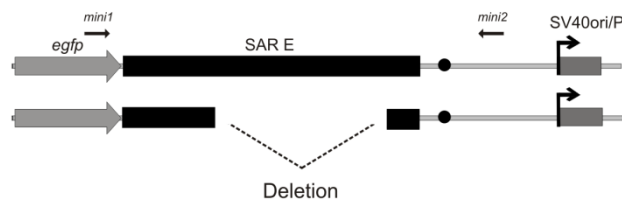
### 2.1.1. „*Scaffold/Matrix Attachment Regions*“ (S/MARs)

S/MARs kommen im Chromatin von allen bisher untersuchten Eukaryoten vor bzw. konnten aus diesen isoliert werden. Es wurden z.B. S/MARs in der Lysozymdomäne des Huhns<sup>[34]</sup> und den Loci der Immunglobulin- und  $\beta$ -Interferongene der Maus<sup>[35,36]</sup> gefunden. Im Menschen wurden S/MARs u.a. im  $\beta$ -Globin-Gencluster<sup>[37]</sup>, der Apolipoprotein B-Domäne<sup>[38]</sup> und im  $\beta$ -Interferon-Locus<sup>[39,40]</sup> entdeckt. Weitere untersuchte Organismen sind z.B. die Hefe<sup>[41]</sup>, die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*<sup>[42]</sup> und *Arabidopsis thaliana*<sup>[43]</sup>. S/MARs wurden an den Domänengrenzen kodierender DNA-Bereiche, jedoch auch in Introns unterschiedlicher Gene, gefunden.<sup>[44,45,46]</sup> Sie besitzen keine Konsensussequenz, jedoch einen hohen AT-Gehalt (70 %). Die Länge von S/MARs umfasst 200-3000 bp und sie stellen sog. „*base unpairing regions*“ (BUR) dar. Häufig zu beobachtende Sequenzmotive sind die bereits erwähnte Topoisomerase II-Bindungsstelle<sup>[47]</sup>, poly(dAdT)-Bereiche („*bending*“-Konformationen)<sup>[48,49]</sup>, „*inverted repeats*“<sup>[50]</sup> und ATATTT-Motive.<sup>[51]</sup> Auf Basis der hohen Tendenz der S/MARs zur Strangtrennung, der damit verbundenen Abhängigkeit der Matrixbindung und der Ausbildung von Sekundärstrukturen<sup>[52,53]</sup>, wurde 1997 eine Software zur Vorhersage von S/MARs entwickelt, das „*stress induced duplex destabilization profile*“ (SIDD) und der „*MAR-finder*“.<sup>[54,55]</sup> Ein SIDD-Profil beschreibt die Stabilität der DNA-

Doppelhelix durch Berechnung der Freien Energie  $G(x)$ , die benötigt wird, um ein Basenpaar an jeder Position der DNA-Sequenz zu trennen.<sup>[56]</sup> Das ermöglicht die Identifizierung jener Loci, die bei der Entstehung negativer Superhelizität zur Strangtrennung neigen. Bei der Berechnung dieses Strangtrennungspotentials wird, nach dem Kompetitionsprinzip, auch der Einfluss der benachbarten DNA-Sequenzen mit einbezogen. In einer Vielzahl von Untersuchungen wurden unterschiedliche Funktionen der S/MARs identifiziert. Wie bereits erwähnt, teilen sie das Genom in voneinander unabhängige Bereiche ein, schirmen diese vor externen Einflüssen bzw. Positionseffekten ab und dienen somit als Isolator.<sup>[57,58]</sup> Weiterhin unterstützen S/MARs die Transkription. Diese Funktion unterscheidet sich jedoch von einer Enhancer-Funktion dahingehend, dass S/MARs nur die Transkription von stabil integrierten bzw. im Kern etablierten Transgenen fördern. Enhancer zeigen ihre transkriptionsfördernde Wirkung bereits in der transienten Phase.<sup>[59,60]</sup> Die Verhinderung der *de novo*-Methylierung durch S/MARs, wodurch eine stabile Langzeitexpression eines Gens ermöglicht werden soll, ist ebenfalls beschrieben worden.<sup>[61]</sup> Zudem besitzen S/MARs teilweise dieselben Sequenzeigenschaften und Verbindungen mit der Kernmatrix wie eukaryotische Replikationsursprünge, wie z.B. einen hohen AT-Anteil, „*inverted repeats*“ und Proteinbindungsstellen für die Initiation der Replikation.<sup>[41,62,63]</sup> Über die ADP-Ribosylierung von Histonen kann es durch das Enzym Poly[ADP-Ribose]Polymerase 1 (PARP-1), welches mit der Kernmatrix und S/MARs assoziiert vorkommt, ebenfalls zur Auflockerung des Chromatins kommen.<sup>[64,65]</sup>

Das 2000 bp lange S/MAR aus dem humanen Interferon  $\beta$ -Gencluster „SAR E“ liegt am 5'-Ende des humanen  $\beta$ -Interferon-Gens (IFNB1) ca. 1,7 kb von der kodierenden Region entfernt.<sup>[40]</sup> Das SAR E besitzt ebenfalls die typischen Eigenschaften eines S/MARs, d.h. es vermittelt die Bindung der DNA an die Kernmatrix, eine erhöhte Transgenexpression<sup>[39,59]</sup> und das Potential zur Einzelstrangtrennung.<sup>[39,53,66]</sup> Darüber hinaus ist es von DNase I-hypersensitiven Stellen (HSS) flankiert.<sup>[67]</sup> Mit Hilfe des Enzyms DNaseI ergibt sich eine bis zu 10x höhere Empfindlichkeit von transkribierten Chromatin-Abschnitten im Vergleich zu genetisch stummen Abschnitten. Hypersensitive Stellen sind sogar 100-1000x empfindlicher gegenüber DNaseI-Behandlungen. Diese Bereiche kommen überwiegend in Promotor und Enhancer-Bereichen aktiver Gene vor. Ein Teil des SAR E wurde sogar durch intramolekulare Rekombination in CHO-K1-Zellen deletiert (SAR M18).<sup>[68]</sup> Dabei behielt es die genannten Fähigkeiten des SAR E.





**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Deletion zur Entstehung des SAR M18** <sup>[69]</sup>

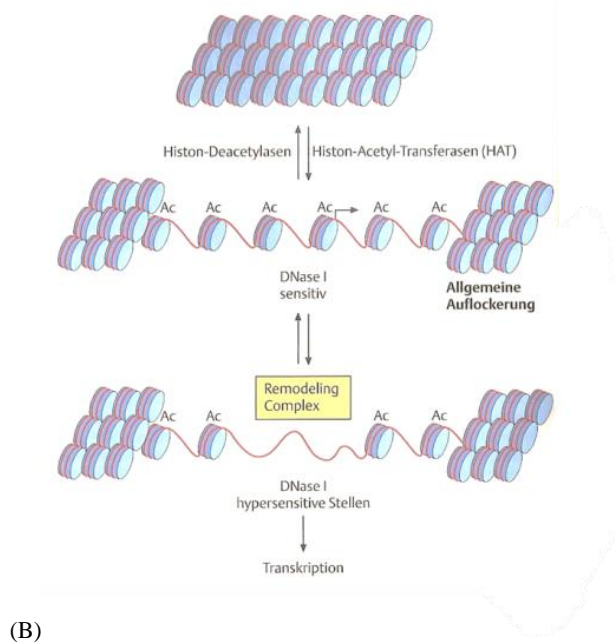
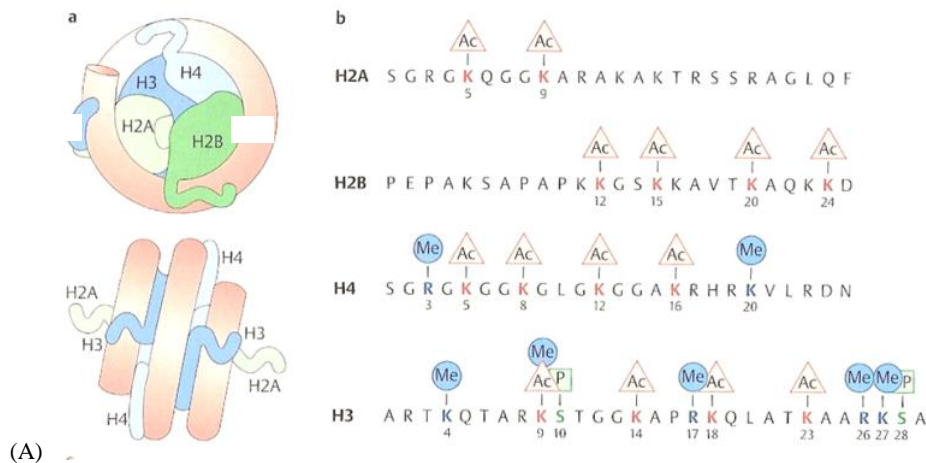
Das SAR E wurde in den Vektor pEPI kloniert. Nach der Transfektion des Vektors in adhärenente CHO-K1-Zellen kam es zu einer intramolekularen Rekombination im SAR E, so dass das SAR E von 2000 bp auf 733 bp verkürzt wurde, ohne die bereits erwähnten Eigenschaften zu verlieren.

### 2.1.2. Der epigenetische Code

Das durch die Methylierung der DNA und durch die unterschiedlichen Histonmodifikationen hervorgerufene Expressionsmuster wird als epigenetischer Code bezeichnet. Durch die Modifikation von Histonen kommt es zur Regulation der Genexpression und der Chromatin-Struktur. Die Aminosäuresequenzen der Histone sind im zentralen globulären Bereich hochkonserviert, die Seitenketten der Aminosäuren in den flexiblen aminoterminalen Domänen können jedoch modifiziert werden. Die Modifikation erfolgt dabei durch Anheftung von Acetylgruppen an Lysin, durch Methylierung von Lysin und Arginin oder durch Phosphorylierung von Serin. Histon-Acetyltransferasen (HATs) übertragen eine Acetylgruppe von Acetyl-CoA auf die  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin-Resten in den flexiblen aminoterminalen Domänen der Histone.<sup>[70,71]</sup> Histon-Methyltransferasen (HMTs) übertragen dagegen Methylgruppen auf Lysin- und Arginin-Reste. Proteinkinasen übertragen eine Phosphatgruppe auf Serine.<sup>[72,73,74]</sup> Wichtig ist dabei der Ort der Modifikationen, da diese in verschiedenen Kombinationen auftreten, teilweise nacheinander oder an einem oder mehreren aminoterminalen Enden. Neben dem DNA-Code ergibt sich also ein weiterer Code, der Histoncode.<sup>[75]</sup>

Die Genome von Wirbeltieren und Pflanzen enthalten, im Gegensatz zu Hefen, Nematoden und *Drosophila*, einen hohen Anteil an methyliertem Cytosin, dem 5-Methylcytosin. Bei Wirbeltieren sind nur Cytosin-Reste in der Dinukleotid-Folge 5'-CpG-3' methyliert. Bei Pflanzen werden zusätzlich auch die Sequenzfolgen CNC und CNN (N= A, T, G, oder C) methyliert. Die Deaminierung von 5-Methylcytosin führt zu Thymin, deshalb sind z.B. in den Genomen von Mensch und Maus nur 20 % der vorkommenden CpG-Folgen methyliert. Die meisten dieser Folgen sind methyliert und kommen in repetitiven DNA-Abschnitten, wie

Satelliten-DNA, SINEs („short interspersed repetitive elements“) und LINEs („long interspersed repetitive elements“), vor.<sup>[76]</sup> Es gibt jedoch auch bis zu mehreren hundert bp lange DNA-Regionen, die reich an CpG-Motiven sind, meist nicht methylierte Cytosine aufweisen und stromaufwärts von >50 % aller menschlichen Gene liegen, die CpG-Inseln.

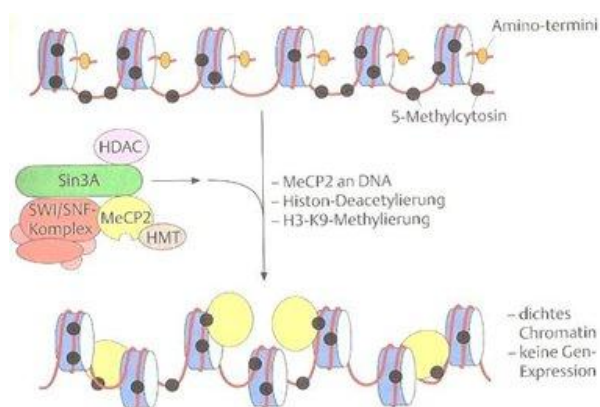


**Abbildung 5: Der Histon-Code** <sup>[79]</sup>

(A) Vereinfachte Skizze eines Nukleosoms mit flexiblen aminoterminalen Enden, die aus der inneren Struktur herausragen. Weiterhin sind Aminosäuren der aminoterminalen Enden dargestellt, die acetyliert, methyliert oder phosphoryliert werden können. Me = Methylierung; Ac = Acetylierung, P=Phosphorylierung. (B) Durch die Übertragung von Acetylgruppen (Ac) auf die Histone kommt es zur Auflockerung des Chromatins. Dadurch zeigt dieser Bereich eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber dem Enzym DNaseI. „Chromatin-Remodeling“ ändert, unmittelbar im 5'-Bereich von Genen, die Lage und Struktur von Nukleosomen. Es entstehen dadurch DNaseI-hypersensitive Bereiche.

Vor aktiv transkribierten Genen sind die Cytosine der CpG-Inseln nie methyliert. Daran ist zu erkennen, dass eine Methylierung von Cytosinen in CpG-Inseln mit einer Blockade

genetischer Aktivität verbunden ist. Die CpG-Inseln des inaktiven X-Chromosoms in weiblichen Säugetierzellen sind zum dauerhaften Abschalten von Genen vollständig methyliert. Unterschiedliche CpG-Inseln werden ebenfalls im Zuge der Ausdifferenzierung von Zellen vorübergehend oder dauerhaft methyliert. Die Methylgruppe ragt in die große Rinne der DNA-Doppelhelix. Dies kann Transkriptionsfaktoren von der DNA verdrängen und weiterhin Proteine mit einer Affinität für methylierte DNA zur Bindung animieren.<sup>[77]</sup> Es sind mehrere Proteine mit einer sog. Methyl-CpG-Bindedomäne bekannt. Ein wichtiges Protein aus dieser Gruppe ist das Methylcytosin-Bindeprotein MeCP2. Dieses Protein bindet spezifisch an methylierte DNA und nimmt Kontakt zu anderen Proteinen auf und bewirkt eine Umstrukturierung bzw. eine Verdichtung des Chromatins. MeCP2 interagiert mit einer Histon-Deacetylase (HDAC), die die Acetylgruppe von Histonen entfernt und somit zur Verdichtung des Chromatins beiträgt. Weiterhin besteht eine Verbindung mit einer Histon-Methyl-Transferase (HMT), die zusätzlich durch Methylierung von bestimmten Lysin-Resten zur Verdichtung des Chromatins beiträgt. Eine Untereinheit des SWI/SNF-Chromatin-Remodelling-Komplexes, welche bei der Verschiebung von Nukleosomen eine Rolle spielt, bindet ebenfalls an MeCP2.<sup>[78]</sup>



**Abbildung 6: Prozess nach der DNA-Methylierung** <sup>[79]</sup>

Durch die Bindung von MeCP2 an der methylierten DNA kommt es zur Bindung eines Komplexes aus mehreren Proteinen, die zur Verdichtung des Chromatins beitragen und somit die Genexpression blockieren.

### 2.1.3. DNA-Reparaturmechanismen bei Doppelstrangbrüchen

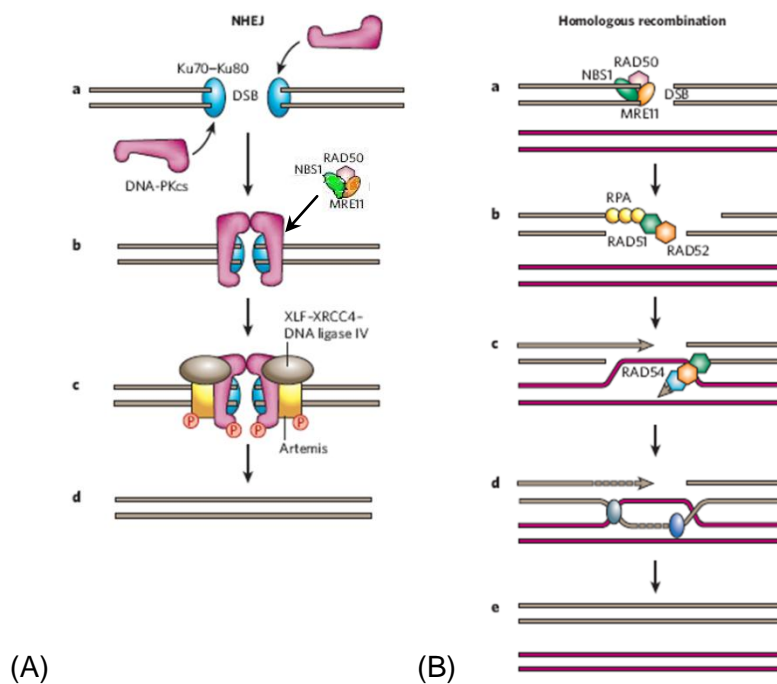
Unter den unterschiedlichen Arten von DNA-Schäden, die in eukaryotischen Zellen auftreten können, gilt der Doppelstrangbruch als eine für die Zelle sehr gefährliche Schädigung. Durch DNA-Doppelstrangbrüche kommt es zum Verlust von genetischer Information oder der Translokation von chromosomalen Abschnitten. Diese Läsionen sind mit einer hohen Letalität behaftet. Doppelstrangbrüche können durch ionisierende Strahlung, mechanischen Stress,

Agentien und oxidativen Stress hervorgerufen werden. Außerdem treten sie auf, wenn bei der DNA-Replikation die Replikationsgabel auf einen Einzelstrangbruch oder andere Läsionen trifft. Weiterhin entstehen sie an den Chromosomenenden durch einen schadhafte Metabolismus der Telomere. Doppelstrangbrüche kommen jedoch auch im Zuge der Rekombination zwischen zwei homologen Chromosomen während der Meiose und als Zwischenstufen in der V(D)J- bzw. Immunglobulin-Rekombination während der Entwicklungsphase vor. Obwohl die Doppelstrangbrüche der Rekombination durch spezielle Enzyme (z.B. RAG1 und RAG2 in der V(D)J-Rekombination) gerichtet eingefügt werden, scheint der Reparaturmechanismus mit dem der ungerichteten Doppelstrangbrüche durch ionisierende Strahlung übereinzustimmen. Zellen können eine gewisse Zahl von DNA-Schäden verkraften.<sup>[80]</sup> Allerdings kann schon ein einziger Doppelstrangbruch zum Zelltod führen, wenn ein essentielles Gen zerstört oder die Apoptose eingeleitet wird.<sup>[81]</sup> Es hat sich gezeigt, dass Doppelstrangbrüche mit Genmutationen, chromosomalen Anomalien bzw. Fehlbildungen und Zelltransformationen einhergehen.<sup>[82]</sup>

Eukaryotische Zellen verfügen über zwei Mechanismen zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen: Die homologe Rekombination (HR) und die nicht-homologe Rekombination („*non-homologous end-joining*“, NHEJ)<sup>[83,84]</sup> (Abbildung 7). In der HR werden die DNA-Enden in 5'-3'-Richtung durch Nukleasen entfernt, so dass Einzelstrangüberhänge entstehen. Die Einzelstrangüberhänge gehen mit komplementären Bereichen des Partnermoleküls Basenpaarungen ein. Die entstehende Struktur wird durch kovalente Verknüpfung der überkreuzten DNA-Stränge stabilisiert. Diese Struktur wird Holliday-Struktur genannt.<sup>[85]</sup> Die Überkreuzungsstelle bzw. eine DNA-Polymerase bewegt sich entlang des Doppelstranges und verlängert den Einzelstrang („*branch migration*“).<sup>[86]</sup> Als DNA-Matrize dient dabei die unzerstörte, homologe Sequenz des Partnermoleküls. Die beiden DNA-Moleküle drehen sich dabei unter ständigem Öffnen und Schließen von Wasserstoffbrücken-Bindungen. Schließlich wird die Holliday-Struktur durch bestimmte Enzyme, die die Überkreuzungsstellen erkennen und symmetrische Einzelstrang-Schnitte einfügen, aufgelöst. An der HR ist eine Vielzahl von Proteinen beteiligt, wie z.B. Rad-50, -51, -52, -54, -55, -57, -59, MRE11, XRS2, Brca1 und Brca2.<sup>[87,88,89,90,91,92]</sup>

Im Gegensatz zur HR wird bei der NHEJ kein unzerstörtes Partnermolekül mit einer Sequenzhomologie benötigt. Dieser Reparaturmechanismus tritt häufig an den Chromosomenenden (Telomeren) auf. Ein wichtiges Molekül der NHEJ ist die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK). Zunächst lagert sich das Protein-Dimer Ku70/Ku80 an

die DNA-Enden. Die beiden Proteine bilden dabei einen Ring, in dessen Öffnung das DNA-Ende zu liegen kommt. Das gebundene Ku70/Ku80-Dimer zieht ein großes Enzym an, die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase, kurz DNA-PKcs („DNA proteinkinase catalytic subunit“), eine Serin-Threonin-spezifische Kinase, die u.a. für die Aktivierung der Ligase-Reaktion verantwortlich ist. Dieser Komplex wird als DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) bezeichnet.<sup>[93]</sup> Die DNA-Enden werden durch Exo- und Endonukleasen gekürzt. Dabei sind der Mre11-Nbs1-Rad50-Komplex, die Flap-Endonuklease und das Protein Artemis beteiligt. Durch die Reparatur-DNA-Ligase IV im Komplex mit dem Protein XRCC4 („x-ray repair cross complementing 4“) werden dann die beiden DNA-Stränge verknüpft.<sup>[94,95,96]</sup> Bei der NHEJ werden durch die Exo- und Endonuklease-Aktivitäten jeweils kleine Deletionen eingefügt.

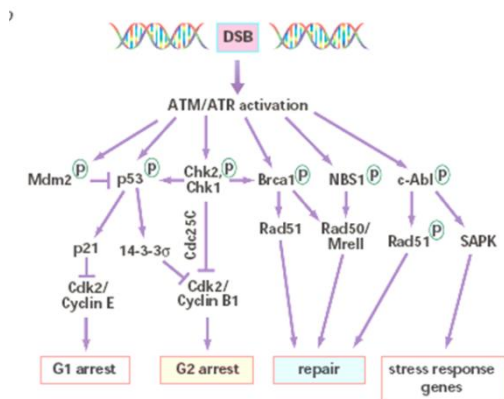


**Abbildung 7: Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in Mammaliazellen** <sup>[97]</sup>

(A) NHEJ: Der Doppelstrangbruch wird durch das Ku-Dimer (Ku70/Ku80) erkannt. Das Protein DNA-PKcs bildet dann mit Ku70/Ku80 einen Komplex. Anschließend werden die DNA-Enden zurechtgeschnitten und nach der Bildung aus einem Komplex aus Mre11-NBS1-Rad50, Artemis, XLF-XRCC4 und der DNA-Ligase IV prozessiert bzw. ligiert. (B) HR: Der Doppelstrangbruch wird durch den MRN11-NBS1-Rad50-Komplex erkannt, gebunden und gekürzt, so dass einzelsträngige Überhänge entstehen. Nun können RPA, RAD51 und RAD52 an die einzelsträngigen DNA-Enden binden. Durch RAD54 wird die Bindung des ssDNA-Protein-Filaments an homologe Bereiche des Partnermoleküls vermittelt. Es bildet sich die Holliday-Struktur aus und die beschädigte DNA wird durch einen sog. „branch migration“-Komplex verlängert und durch eine Resolvase verknüpft.

Bei der DNA-Strangbrucherkenkung stellt das Polyprotein ATM/ATR den Startpunkt einer Signalkaskade, die mit der DNA-Reparatur, dem Anhalten des Zellzyklus oder der Apoptose

der Zelle endet, dar.<sup>[98,99,100]</sup> Die komplette Signalkaskade bzw. die daran beteiligten Proteine zur Erkennung der DNA-Strangbrüche sind bisher noch nicht vollständig aufgeklärt und werden kontrovers diskutiert. Außer den beiden Hauptwegen der DNA-Doppelstrangreparatur gibt es noch zwei weitere Wege: Das homologieabhängige „*single-strand annealing*“, welches Komponenten des HR und NHEJ verwendet, dessen genaue Funktion jedoch noch unbekannt ist<sup>[101]</sup> und die „*alternative-NHEJ*“, in der scheinbar die Poly(ADP-Ribose)Polymerase 1 und die Ligase III beteiligt sind.<sup>[102,103]</sup>



**Abbildung 8: Mögliche Signalkaskade nach einem Doppelstrangbruch**<sup>[104]</sup>

Eine zentrale Rolle bei der Erkennung von Doppelstrangbrüchen in der Zelle spielt die ATM/ATR-Aktivität. Wie ATM im Detail aktiviert wird, wird zurzeit diskutiert. Das aktivierte ATM gibt das Signal des DNA-Doppelstrangbruchs durch Phosphorylierung an Moleküle des Zellzyklus, der DNA-Reparatur und der Stressantwort weiter.

Die Doppelstrangbruch-Reparaturwege sind zwischen den niederen und höheren Eukaryoten konserviert. NHEJ ist in höheren Eukaryoten im Gegensatz zu niederen Eukaryoten der bevorzugte Weg der Doppelstrangbruch-Reparatur. Dies hängt wahrscheinlich mit der Zusammensetzung des jeweiligen Genoms zusammen. Hefen besitzen ein relativ dicht gepacktes Genom mit wenigen repetitiven Sequenzen, Säugergenome dagegen besitzen ein repetitiv geprägtes Genom. Die Gefahr von „*pop-out*“-Deletionen oder Translokationen bei HR wäre damit erhöht, da repetitive Sequenzen bei der HR als homologe Sequenzen verwendet werden können. Es wird angenommen, dass die HR in Säugerzellen eine wichtige Rolle in der Mitose, in der späten S-Phase und in der G2-Phase des Zellzyklus übernimmt.<sup>[105,106]</sup> NHEJ dominiert dagegen in der G1- und der frühen S-Phase.<sup>[107,108]</sup> Während der Replikation wird die Reparatur der, in dieser Phase häufig auftretenden, Doppelstrangbrüche überwiegend von der HR übernommen.<sup>[105,109,110]</sup> Die Untersuchungen zum Verhältnis von HR zu NHEJ sind teilweise widersprüchlich. In CHO-Wildtypzellen wurde der Anteil der HR an der gesamten Doppelstrangbruch-Reparatur auf 10-50% geschätzt.<sup>[111,112]</sup> Untersuchungen haben gezeigt, dass die Repression einer der beiden

Reparaturwege zu einer Steigerung der Aktivität des jeweils anderen Reparaturweges führt.<sup>[113,114]</sup>

In der Zelllinienentwicklung werden bei der Integration von Fremd-DNA in die chromosomale DNA die Reparaturmechanismen der eukaryotischen Zelle genutzt. Es gibt dabei zwei Arten von Integrationsmechanismen: Entweder es besteht eine Sequenzhomologie zwischen der Fremd-DNA und der chromosomalen Wirts-DNA, so dass es durch homologe Modifikation zur Integration kommt, oder es findet eine nicht-homologe bzw. illegitime Integration in das Genom statt. Die illegitime Integration von Fremd-DNA kann dabei zu unvorhergesehenen genomischen Modifikationen führen, da der Ort der Integration nicht gezielt angesteuert werden kann.

## **2.2. Strategien zur Expression von Transgenen in Mammaliazellen**

In der Molekularbiologie bzw. in der Zelllinienentwicklung wird ständig nach neuen Methoden bzw. Verfahren gesucht, um das Genom der Zelle zu manipulieren oder modifizieren. Der Grund dafür ist entweder die Steigerung der Expression von rekombinanten Proteinen oder die gezielte Modifikation von Zellen in der Gentherapie. Der am häufigsten verwendete Mechanismus ist die Integration der Fremd-DNA, die zur Veränderung des Genoms der Zielzelle führt. Der erste Schritt beim Gentransfer ist das Einbringen der Fremd-DNA in die Zielzelle, die Transfektion. Es existieren zahlreiche Transfektionsmethoden, um die Fremd-DNA in das Zytoplasma der Zelle einzubringen, den Transport der Fremd-DNA in den Zellkern übernehmen jedoch überwiegend zelluläre Komponenten.<sup>[115,116]</sup> Nachdem die Fremd-DNA in den Zellkern gelangt ist, wird ein Großteil abgebaut oder im Zuge der Zellproliferation ausgedünnt.<sup>[117]</sup> Fremd-DNA-Moleküle, die jedoch einen Replikationsursprung („*origin of replication*“, ori; meist aus Viren) oder ein S/MAR enthalten, können unter bestimmten Bedingungen als extrachromosomale Episomen über mehrere Zellgenerationen im Kern existieren. Dies wird z.B. durch die Expression von viralen Tumorentigenen oder der Anheftung an die Kernmatrix vermittelt.<sup>[118]</sup> Die Integration der Fremd-DNA ohne ein ori oder ein S/MAR in die chromosomale DNA findet abhängig vom Zelltyp bei ungefähr 1 von 1000 DNA-Molekülen statt.<sup>[119,120]</sup> Wie bereits in 2.1.3. erwähnt, kann die Fremd-DNA durch zwei unterschiedliche Prozesse integriert werden: Die homologieabhängige Genommodifikation oder die illegitime Integration. Die homologieabhängige Genommodifikation beruht auf der Verwendung von homologen Sequenzen der Fremd-DNA und der chromosomalen DNA. Dieser Prozess führt überwiegend zu vorhersagbaren Ergebnissen bzw. Integrationen an bestimmten Genloci und wird für unterschiedliche Ansätze

verwendet.<sup>[121]</sup> Unter anderem werden bei der „*small fragment homologous recombination*“ (SFHR) kurze DNA-Fragmente (400-800 bp) verwendet, um Punktmutationen einzufügen.<sup>[122]</sup> Andere Techniken, wie das klassische „*gene targeting*“, werden genutzt, um bestimmte Orte im Genom oder Knock-out-Gene anzusteuern.<sup>[123]</sup> Diese Methoden sind ein wichtiges Werkzeug in der Gentherapie und in der Untersuchung der Dynamik des Chromatins. Jedoch kommt es neben der geplanten homologie-abhängigen Modifikation immer auch zur illegitimen Integration der Fremd-DNA. Die illegitime Integration tritt teilweise sogar häufiger auf als die homologie-abhängige Modifikation, das Verhältnis liegt abhängig von den experimentellen Bedingungen und der verwendeten Zelllinie bei 4:1-1:1000000 (homologe Integration : nicht-homologe Integration). Im Durchschnitt tritt die illegitime Integration 1000x-10000x häufiger auf.<sup>[124]</sup> Dadurch wird natürlich die Vorhersagbarkeit von Integrationsorten bei einer geplanten homologie-abhängigen Modifikation stark beeinträchtigt. Der Mechanismus, der steuert, welche Integrationsart auftritt, ist bisher unklar. Ein Ansatz bietet dabei die Untersuchung der Reparaturmechanismen in den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus. Wie bereits in 2.1.3. erwähnt, kommt es in der späten S-Phase und in der G2-Phase des Zellzyklus überwiegend zu einer HR, während die NHEJ in allen Phasen vorkommen kann.<sup>[108]</sup>

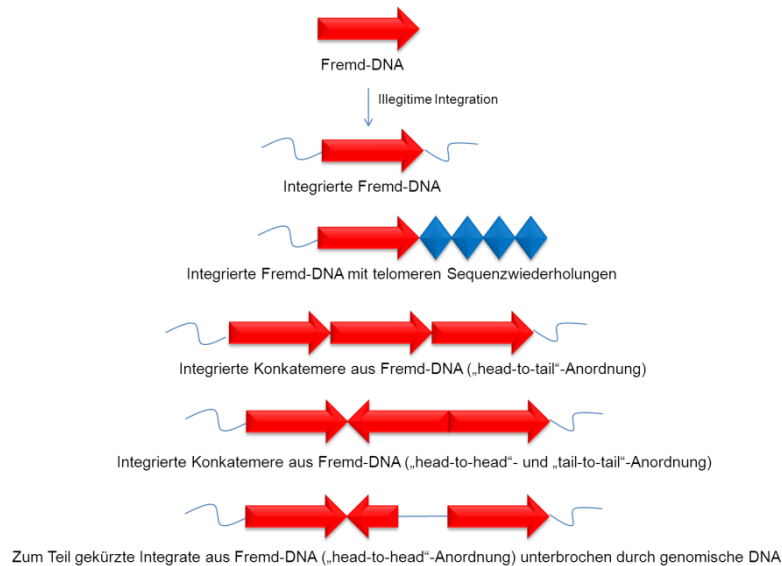
### 2.2.1. Modifikation und Integration von Fremd-DNA

Der größte Teil der transfizierten DNA wird im Zellkern sofort wieder abgebaut.<sup>[117]</sup> Die Moleküle, die nicht abgebaut werden, werden häufig jedoch nicht ohne Modifikation integriert. Bei der homologie-abhängigen Integration kann es durch die Nutzung von inter- und intramolekularen Sequenzhomologien zu ganz unterschiedlichen Produkten führen. Dies hängt mit der Organisation der homologen Sequenz im Genom zusammen.<sup>[125,126,127,128,129,130]</sup> Wenn die linearisierte Fremd-DNA an den Enden Mikrohomologien bzw. durch Deletion oder Addition von Nukleotiden entstandene Homologien trägt, kommt es häufig zur „*multi-copy integration*“.<sup>[131,132,133]</sup>

In die transfizierte Fremd-DNA können durch die illegitimen Integrationsmechanismen auch Punktmutationen, Deletionen oder komplexe Neuarrangements, wie z.B. die Integration von genomischer DNA, stattfinden.<sup>[134,135,136,137]</sup> Lineare extrachromosomale DNA kann auch im Zellkern mit hoher Effizienz zirkularisiert oder hintereinander zu Konkatemeren verknüpft werden.<sup>[138,139,140]</sup> Illegitime Integrationen können überdies auch das Methylierungsmuster der Zelle beeinträchtigen.<sup>[141]</sup> Die Chromatin-Verpackung und der Methylierungsstatus können ebenfalls durch die Kopienzahl der integrierten DNA beeinträchtigt werden („*repeat-induced*



*gene silencing*“, RIGS).<sup>[142,143]</sup> Der Ort der Integration eines Vektors im Genom kann auch zu einem sog. Integrations-„*hotspot*“ werden, in den als „*tandem-repeats*“ mehrere Vektoren integrieren können.<sup>[133]</sup> Mögliche Integrationen sind in Abbildung 9 dargestellt.



**Abbildung 9: Integration von Fremd-DNA** <sup>[nach 144]</sup>

Dargestellt ist eine Auswahl an Möglichkeiten zur Integration von Fremd-DNA in die genomische DNA.

Bisher ist nicht bekannt, ob die Modifikation der transfizierten Fremd-DNA vor oder während der Integration stattfindet. Die Menge der Integrationen und die Organisation der integrierten DNA hängen stark vom Zelltyp ab. Untersuchungen haben gezeigt, dass humane bzw. Primaten-Zelllinien 30x-100x weniger exogene DNA integrieren als Nagetierzelllinien (NIH3T3, CHO, Ltk<sup>-</sup>).<sup>[145,146,147,148]</sup> Weiterhin hängt offensichtlich die Menge an integrierter DNA und die Art der Integration auch von der Transfektionsmethode ab. Bei der Elektroporation z.B. integriert nur eine geringe Menge an Fremd-DNA und dann auch nur mit gewissen Modifikationen bzw. nicht in einer „*head-to-tail*“-Anordnung <sup>[149]</sup>, da die Beeinträchtigung der Zelle sich nicht nur auf die Induktion von Strangbrüchen beschränkt.

Neuere Entwicklungen beschäftigen sich mit dem Rekombinase-vermittelten Kassettenaustausch („*recombinase mediated cassette exchange*“, RMCE) <sup>[150]</sup> und der Nutzung von Zinkfinger-Nukleasen.<sup>[151]</sup>

Beim RMCE wird ein Vektor mit einem Selektions- bzw. „*screening*“-Marker, der von zwei heterospezifischen Rekombinaseerkennungstellen flankiert wird, durch illegitime Integration in das Genom der Zielzelle eingebracht („*tagging*“). Nach der Selektion der Zellen mit der erwünschten Integration werden diese mit einem Vektor transfiziert, der, flankiert von

denselben heterospezifischen Rekombinaseerkennungstellen, das „*gene of interest*“ trägt. In diesem Fall kann durch eine spezifische Rekombinase (z.B. Cre-Rekombinase oder FLP-Rekombinase) die „*tagging*“-Kassette gegen die Kassette auf dem Vektor ausgetauscht werden („*targeting*“). Dabei wird ein Vektor mit dem Gen für die Rekombinase parallel zum „*targeting*“-Vektor in die Zelle transfiziert.

Bei einer sequenzspezifischen Zinkfinger-Nuklease wurde eine unspezifische „*cleavage*“-Domäne der FokI-Endonuklease mit der sequenzspezifischen DNA-Bindungsdomäne des Zinkfingerproteins fusioniert. Dieses Protein fügt sequenzspezifische Doppelstrangbrüche ein, sodass u.a. Fremd-DNA durch Homologie-abhängige oder nicht-homologe Integration in das Zielgenom eingebracht werden kann. Dieses Verfahren erhöht somit die Wahrscheinlichkeit einer Integration an einem bestimmten Ort im Genom. Wie auch beim RMCE besteht bei der Nutzung von Zinkfinger-Nukleasen jedoch weiterhin die Gefahr einer unspezifischen Integration oder einer unspezifischen Aktivität der Zinkfinger-Nuklease <sup>[152]</sup>, sodass auch in Zukunft die Selektion der Zellen mit der gewünschten Modifikation nötig sein wird.

### 2.2.2. Extrachromosomal replizierende Vektorsysteme

Extrachromosomale bzw. episomal replizierende Vektoren besitzen gegenüber den integrierenden Vektoren einige Vorteile. Die Funktion und die Regulation der Gene im Genom wird nicht beeinflusst. Es kommt also nicht zu einer Insertionsmutagenese oder Zelltransformation. Weiterhin besteht bei episomalen Vektoren eine höhere Wahrscheinlichkeit des Vorliegens von mehr als einer Kopie des episomalen Vektors, so dass eine höhere Expression des „*gene of interest*“ zu erwarten ist. Die hohe Klonierungskapazität von extrachromosomalen Vektoren ist ein weiterer Vorteil. <sup>[153,154,155,156]</sup>

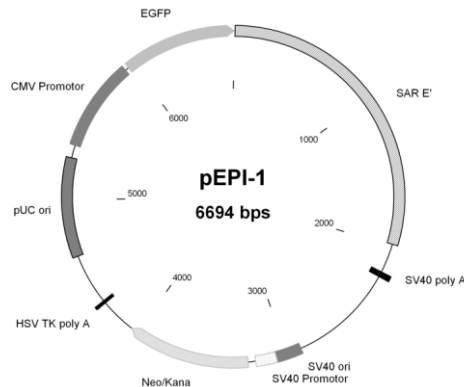
Es gibt drei unterschiedliche extrachromosomale Vektorsysteme: Die viralen episomalen Vektoren, die S/MAR-basierten Vektoren und die künstlichen Chromosomen („*artificial chromosomes*“). Bei den viralen Episomen werden virale Replikationsursprünge und ein virales Protein, das für die Replikation und die Weitergabe an die Tochterzelle verantwortlich ist, benötigt. Das erste virusbasierte, episomale Vektorsystem stammte vom SV40-Virus. Diese Vektoren enthalten einen cis-aktiven SV40-ori und ein trans-aktives Protein, das „*SV40 Large T Antigen*“, welches an das SV40-ori bindet und die Replikation des Vektors vermittelt. Dieses System ist jedoch nur für eine transiente Expression geeignet, da der Vektor in einer sehr hohen Kopienzahl vorliegt, d.h. unabhängig vom Zellzyklus repliziert. Dies führt bereits wenige Tage nach der Transfektion zum Zelltod durch Überlastung der Zelle. <sup>[157]</sup> Das erste

stabile Vektorsystem nutzte das BK-Virus-ori zusammen mit dem „BK Large T Antigen“.<sup>[158]</sup> Dabei konnte, abhängig von der Zelllinie, eine Kopienzahl von 20-120 Vektorkopien pro Zelle und nur ein geringer Anteil an Integrationen beobachtet werden. Ein weiteres System stammt vom „*bovine papilloma virus-1*“ (BPV-1), bestehend aus einem BPV-1-Fragment aus der frühen Region und zwei viralen Proteinen, E1 und E2, die für die Replikation des Vektors verantwortlich sind.<sup>[159,160,161]</sup> Die größten Fortschritte wurden jedoch mit Vektoren, die den ori aus dem Epstein-Barr-Virus („*origin of plasmid replication*“, oriP) zusammen mit dem „*EBV Nuclear Antigen-1*“ (EBNA-1) trugen, gemacht.<sup>[162,163,164,165]</sup>

Die Entwicklung von künstlichen Chromosomen begann mit der Entwicklung eines Assays zur Identifizierung von oris in *Saccharomyces cerevisiae*, der zur Identifizierung von autonom replizierenden Sequenzen führte.<sup>[166]</sup> Die Entdeckung von Zentromeren und Telomeren der Hefe ermöglichte dann die Entwicklung eines „*yeast artificial chromosome*“ (YAC), welches eine hohe mitotische Stabilität zeigte.<sup>[167]</sup> Dieses Experiment führte zu der Erkenntnis, dass Zentromere, Telomere und oris für die extrachromosomale Erhaltung nötig sind und sich dieses auch auf Mammaliazellen transferieren lässt.<sup>[168]</sup> Das erste „*human artificial chromosome*“ (HAC) wurde aufgrund der Entdeckung der Telomersequenzen und der  $\alpha$ -Satelliten-DNA in den Zentromeren von Mammaliazellen konstruiert.<sup>[169,170]</sup> Die Co-Transfektion von synthetischer  $\alpha$ -Satelliten-DNA, genomischen DNA-Fragmenten und Telomersequenzen führte zur Bildung von einem linearen artifiziellen Chromosom von 6-10 Mbp mit einer hohen mitotischen Stabilität und funktionellen Zentromeren. Mittlerweile gibt es zwei unterschiedliche Verfahren zur Herstellung von künstlichen Chromosomen, die „*top-down*“-Methode und die „*bottom-up*“-Methode. Bei der „*top down*“-Methode wird ein Chromosom durch Bestrahlung oder durch Transfektion von Telomer-DNA fragmentiert.<sup>[171,172]</sup> Bei der „*bottom-up*“-Methode wird, wie bei dem ersten „*human artificial chromosome*“, eine Cotransfektion mit Zentromer-, Telomer- und genomischen Sequenzen durchgeführt. Dabei kommt es zu einer *de-novo*-Generation von einem artifiziellen Chromosom. Die Nutzung von YACs, BACs („*bacterial artificial chromosomes*“) und PACs („*P1-derived artificial chromosomes*“) erlaubt die Konstruktion von vielen unterschiedlichen HACs, da es ebenfalls möglich ist, diese vor der Transfektion in Mammaliazellen herzustellen.<sup>[173]</sup> Der Vorteil der HACs ist ihre große Klonierungskapazität (bis zu 300 kb) und ihre mitotische Stabilität von 94-100 %.

1999 wurde der erste S/MAR-basierte Vektor, pEPI-1, entworfen. Das S/MAR stammte dabei aus dem humanen Interferon  $\beta$ -Gen (SAR E).<sup>[174]</sup> In Assoziation mit Proteinen der Kernmatrix

übernimmt dieses Element die Funktionen des „SV40 Large T Antigen“ im Ursprungsvektor pGFP-C1.



**Abbildung 10: Vektorkarte des Vektors pEPI-1**

Der Vektor enthält eine Transkriptionseinheit. Diese besteht aus einem CMV-Promotor, dem EGFP-Reportergen und einem SV40 early polyA-Signal. SAR E aus der 5'-Region des humanen Interferon- $\beta$ -Gens ist zwischen das EGFP-Reportergen und dem SV40 polyA-Signal kloniert. Der SV40 Promotor/ORI dient der Transkription des Selektionsmarkers Neomycin-Phosphotransferase, der eine Resistenz gegenüber G418 und Kanamycin vermittelt. Der pUC19 ori dient als Replikationsstartpunkt bei der Vermehrung des Plasmids in *E. coli*. Das HSV TK polyA-Signal ist Teil der Neo/Kana-Transkriptionseinheit.

Untersuchungen zeigten, dass dieser Vektor in der Lage ist, in einer geringen Kopienzahl episomal im Zellkern für mehrere Generationen ( $> 100$ ) zu verbleiben. Die mitotische Stabilität lag dabei bei 98 %. Das S/MAR übernimmt bei der episomalen Etablierung eine entscheidende Rolle, da ohne S/MAR nur integrierte Vektor-DNA gefunden wurde.<sup>[174]</sup> Die Bindung des S/MARs an Proteine der Kernmatrix und die Tatsache, dass die Replikation in Verbindung mit diesen Proteinen stattfindet, lässt erkennen, dass durch das S/MAR die Replikation des Vektors vermittelt wird.<sup>[175,176]</sup> Durch *in situ*-Hybridisierung und Kern-Fraktionierung wurde eine nicht-kovalente Bindung von pEPI mit der Kernmatrix bzw. mit dem Protein SAF-A gezeigt.<sup>[177,178]</sup> Die Interaktion des S/MARs mit dem Protein SAF-A, wird durch ein 180 bp-Modul des S/MARs vermittelt. Ein Tetramer aus diesem Modul konnte das Original-S/MAR sogar ersetzen.<sup>[179]</sup> Die Replikation des pEPI-Vektors erfolgt zusammen mit der chromosomalen DNA in der frühen S-Phase.<sup>[180]</sup> Die Bindungsstellen des „*origin recognition complex*“ (ORC) sind dabei über den gesamten Vektor verteilt. Die Startpunkte der Replikation werden somit durch epigenetische Faktoren, wie die Konformation des Chromatins und spezifisch gebundene Transkriptionsfaktoren bestimmt. Für die korrekte

Funktion des S/MARs ist es wichtig, dass die Transkription in das S/MAR hineinläuft.<sup>[181]</sup> Die stabile Etablierung des pEPI-Vektors wurde für unterschiedliche Zelllinien gezeigt (CHO, HeLa, HaCat, CD34+ Progenitorzellen), jedoch war bei jeder Zelllinie ein initialer Selektionsdruck für 2-3 Wochen nötig, um den Vektor stabil zu etablieren. Weiterhin wurde während der Kultivierung nach dem initialen Selektionsdruck ohne diesen ein Rückgang der Transgenexpression bzw. des Anteils der exprimierenden Zellen durch Vektorverlust und Histondeacetylierung beobachtet.<sup>[182,183]</sup> Aufgrund dessen kam es zur Weiterentwicklung des pEPI-Vektors zu einem Minicircle-Vektor.<sup>[182,68]</sup>

### 2.2.3. Minicircle-DNA

Die Nachteile des pEPI-1-Vektors sind die geringe Etablierungsrate als Episom, die Tendenz zur ungerichteten Integration in das Wirtsgenom, die Notwendigkeit eines Selektionsdrucks, die Inaktivierung durch zelluläre Mechanismen, die Vektorinstabilität und die geringe Klonierungskapazität.<sup>[182]</sup> Um diese Nachteile zu vermeiden, wurden bakterielle Sequenzen zunächst aus dem Vektor entfernt, um den CpG-Gehalt des Vektors zu senken. Dieser Parameter erwies sich nachfolgend jedoch als bedeutungslos<sup>[184]</sup>, wonach andere Strukturmerkmale bakterieller DNA in den Vordergrund rückten. Diese gekürzten Plasmide, die frei von bakteriellen Sequenzen sind, werden als Minicircles bezeichnet. Es konnte gezeigt werden, dass die Reduktion des CpG-Gehalts zu einer höheren und längeren Transgenexpression führt<sup>[185]</sup> und dass nur ein CpG im bakteriellen „backbone“ des Plasmids ausreicht, um Entzündungsreaktionen bzw. „gene silencing“ auszulösen. Es gibt mehrere Methoden, um aus einem Plasmid einen Minicircle zu generieren.<sup>[186,187,68]</sup> Das bakterielle „backbone“ des Plasmids wird dabei jeweils von zwei Rekombinaseerkennungstellen flankiert. Durch Induktion der jeweiligen Rekombinase bzw. der Expression der Rekombinase kommt es durch Rekombination zur Ausbildung von zwei kleineren, zirkulären ccc-Plasmiden, dem Miniplasmid, bestehend aus dem bakteriellen „backbone“, und dem Minicircle, bestehend aus der Expressionskassette für Mammaliazellen. Die Rekombination findet jeweils in Bakterien statt und die Rekombinase-Expressionskassette ist entweder in das bakterielle Genom integriert oder wird auf dem Plasmid co-exprimiert. Die verwendeten Rekombinasen sind dabei die Cre-Rekombinase<sup>[188]</sup>, die  $\phi$ C31 Rekombinase<sup>[187]</sup>, die ParA-Resolvase<sup>[191]</sup>, die  $\lambda$  Integrase<sup>[188]</sup> und die FLP Rekombinase<sup>[68, vorliegende Arbeit]</sup>. Zusätzlich zur Entfernung der bakteriellen Sequenzen können zur Steigerung der Transgen-Expression und Verhinderung des „gene silencing“ unterschiedliche eukaryotische DNA-Elemente in die Minicircle-Region eingebracht werden, wie z.B. UCOEs („ubiquitous chromatin opening

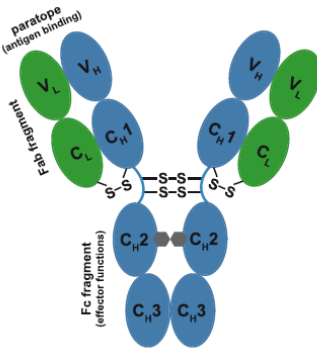
*element*“), Enhancer, Isolatoren oder natürlich auch S/MARs.<sup>[189]</sup> Der Minicircle aus pEPI-1 wurde mithilfe der FLP-Rekombinase generiert. Vorher wurde in dem verwendeten pEPI-1-Vektor der CMV-Promotor gegen den SV40-Promotor ausgetauscht. Dieser Minicircle zeigte aufgrund der fehlenden bakteriellen Sequenzen und des S/MARs eine erhöhte und verlängerte Transgen-Expression verglichen mit dem pEPI-1-Vektor. Dabei war zur Etablierung dieses Minicircles kein initialer Selektionsdruck nötig.<sup>[68]</sup> Minicircles konnten ebenfalls ohne Selektionsdruck in Herz-, Muskel- und Leberzellen der Maus etabliert werden.<sup>[190,188]</sup> Eine weitere Verbesserung der Expressionswerte in CHO-Zellen konnte bei der Verwendung des verkürzten SAR M18 beobachtet werden.<sup>[68]</sup>

2008 wurde ein Verfahren zur Herstellung von Minicircles im industriellen Maßstab entwickelt.<sup>[191]</sup> Das Verfahren wird als „*recombination based plasmid separation*“-Technologie (RBPS) bezeichnet. Dabei erzeugt eine spezifische Rekombinase, die ParA-Resolvase, durch intramolekulare Rekombination aus dem Plasmid mit den entsprechenden Rekombinaseerkennungstellen den Minicircle. Der entstandene Minicircle enthält bei diesem System eine Lac-Operator-Sequenz. Durch diese Sequenz kann der Minicircle durch die Interaktion mit dem Lac-Repressor-Protein, das an eine Affinitätssäule gebunden ist, von DNA- (Miniplasmid und restliches Ausgangsplasmid) und Proteinverunreinigungen mittels Protein/DNA-Affinitätschromatographie getrennt werden. Die aufgereinigte Minicircle-DNA besteht dabei aus 99% ccc-DNA-Monomeren. Der Nachteil dieses Verfahrens ist die aufwendige und kostenintensive Herstellung des Minicircles.


### 2.3. Die Expression von rekombinanten IgG in Mammaliazellen

Die Prozessierung von sekretorischen Proteinen in Mammaliazellen startet im Endoplasmatischen Reticulum (ER). Diese unterliegen dort einer strengen Qualitätskontrolle bevor sie in den Golgi-Apparat transportiert und schließlich sekretiert werden.<sup>[192]</sup> Dies umfasst im Allgemeinen die Kontrolle der korrekten Faltung des Proteins, die korrekte posttranslationale Modifikation und die richtige Oligomerisierung.<sup>[192,193,194]</sup> Die Antikörperklasse des Immunglobulin G (IgG) unterliegt z.B. diesen Kontrollen. IgG ist ein Heterodimer aus je zwei identischen leichten (L) und schweren (H) Ketten<sup>[195,196]</sup>, die durch Cystein-Brücken verbunden sind.<sup>[197]</sup> Strukturell werden die konstanten ( $C_H$ ,  $C_L$ ) und die variablen Domänen ( $V_H$ ,  $V_L$ ) der schweren und leichten Kette unterschieden, funktionell bindet die  $F_C$ -Region an Rezeptoren, während die Bindung an das Antigen durch die  $F_{ab}$ -Region erfolgt. Diese ist hypervariabel: Die 6 komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDR) bestehen aus jeweils etwa 20 Aminosäuren und erlauben demnach theoretisch  $20^{6 \times 20}$

statt und es wird ein funktionelles IgG gebildet und sekretiert.<sup>[204,205]</sup>



**Abbildung 11: Schematische Darstellung eines IgG-Moleküls.**<sup>[205]</sup>

Das IgG-Molekül besteht aus zwei schweren (blau) und zwei leichten Ketten (grün). Die schwere Kette besteht aus der V<sub>H</sub>-, C<sub>H</sub>1-, C<sub>H</sub>2- und der C<sub>H</sub>3-Domäne. Die leichte Kette besteht aus der C<sub>L</sub>- und der V<sub>L</sub>-Domäne. Die C<sub>H</sub>2-Domäne der schweren Kette ist mit einem komplexen Oligosaccharid glykosyliert (  ). Jede Domäne besitzt eine interne Disulfidbrücke. Zusätzliche Disulfidbrücken verbinden die schweren Ketten in der flexiblen „hinge“-Region. Eine weitere Disulfidbrücke verbindet die C<sub>H</sub>1- mit der C<sub>L</sub>-Domäne. Die zwei identischen Antigenbindungsstellen („paratope“) sind aus den zwei variablen Domänen, V<sub>L</sub> und V<sub>H</sub>, zusammengesetzt. Das IgG-Molekül wird überdies in zwei Fab-Fragmente (bestehend aus V<sub>H</sub>, C<sub>H</sub>1, V<sub>L</sub> und C<sub>L</sub>) und ein Fc-Fragment (bestehend aus zwei C<sub>H</sub>2 und zwei C<sub>H</sub>3) eingeteilt.

Im Gegensatz zu polyklonalen Antikörpern, die durch Immunisierung eines Tieres gewonnen werden und aus einem Gemisch von Antikörpern unterschiedlicher Selektivität bestehen, sind monoklonale Antikörper homogen. Alle IgGs eines monoklonalen Antikörpers sind identisch, d.h. sie besitzen die selbe Aminosäure-Sequenz und Proteinfaltung. Die monoklonalen Antikörper (Mab) stellen eine große Klasse von rekombinanten Proteine für therapeutische und diagnostische Ziele dar und werden in Mammaliazellen in Kultur hergestellt.<sup>[206,207]</sup> Eine

große Herausforderung ist, wie bereits erwähnt, die Expression, die Faltung und der Zusammenbau von zwei unterschiedlichen Polypeptiden, der leichten und der schweren Kette.<sup>[208,209]</sup> Um den Anteil an funktionellen Antikörpern zu erhöhen, kann z.B. das optimale Verhältnis von leichter Kette zu schwerer Kette bestimmt werden.<sup>[210]</sup>

## **2.4. Aufgabenstellung**

In unterschiedlichen Untersuchungen wurden nicht-virale, selbstreplizierende pEPI-Minicircles, die von prokaryotischen Sequenzanteilen befreit sind, als vielversprechende Alternative für die Anwendung in der Gentherapie und die Produktion von rekombinanten Proteintherapeutika beschrieben. Der Vorteil dieser Minicircles lag in der stabilen Langzeitexpression und der Vermeidung von illegitimen Integrationen, da sie ausschließlich episomal replizieren sollten.<sup>[69]</sup> Zur episomalen Etablierung bzw. Replikation dieses Minicircles ist nur eine aktive Transkriptionseinheit verbunden mit dem SAR E-Element nötig. Das verkürzte S/MAR-Element SAR M18 sollte eine erhöhte episomale Stabilität und Transgenexpression verglichen mit dem SAR E vermitteln.<sup>[68]</sup> Die stabile Expression sollte dabei auf der Anwesenheit von bis zu 10 identischen oder unterschiedlichen Minicircles pro Zelle beruhen.

In Vorstudien wurde ein auf dem SAR M18-Minicircle basierendes, episomal replizierendes Co-Expressionssystem entwickelt, das in CHO-K1-Zellen zur Sekretion von funktionalen IgG-Molekülen und zu dessen stabiler Expression führt. Ziel dieser Arbeit war die industrielle Implementierung und biotechnologische Weiterentwicklung dieses Co-Expressionssystems sowie die Produktion von Minicircle-DNA zur Routineanwendung unter industriellen Standards für die Herstellung von pharmazeutischen Proteinen mit Säugerzellen.



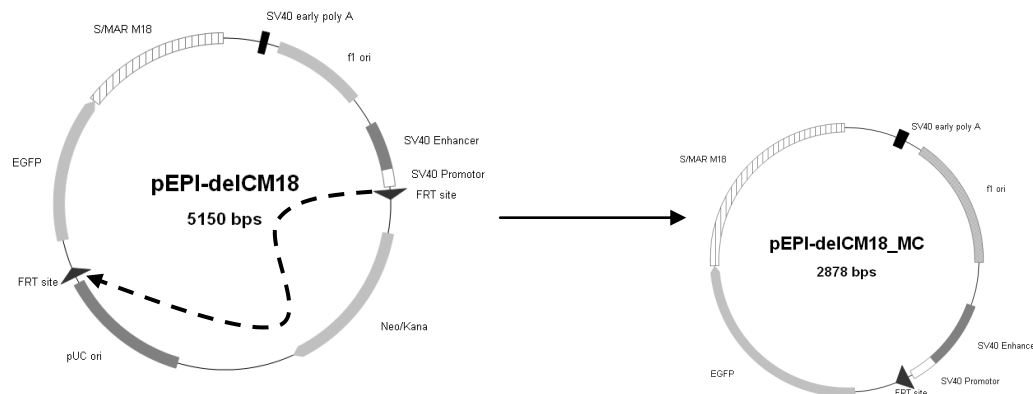
### **3. Ergebnisse**

Wie bereits erwähnt, sind die pEPI-Minicircles (MCs) eine Weiterentwicklung des pEPI-Vektortyps, die von prokaryotischen Sequenzanteilen befreit wurden. In unterschiedlichen Untersuchungen hat sich gezeigt, dass sich diese nichtviralen, selbstreplizierenden, episomalen DNA-Moleküle sowohl für die transiente Hochexpression <sup>[211]</sup> als auch für die konservative, nicht-destruktive Etablierung permanenter Zelllinien anbieten. Neben den Kerneigenschaften des Minicircles kommt dem System die ungehinderte transkriptionsfördernde Wirkung der S/MARs zugute. Die Minicircles sind dabei über das S/MAR durch nicht-kovalente Bindungen mit den Metaphase-Chromosomen verbunden und bleiben dadurch als Episomen erhalten. Die stabile Expression beruht dabei auf der Anwesenheit von bis zu 10 identischen oder unterschiedlichen Minicircles pro Zelle. Vorstudien von R. Kandimalla <sup>[zitiert in: 212]</sup> haben die Eignung eines Zwei-Minicircle-Systems mit pEPI als Grundlage eines flexiblen Systems zur Antikörperproduktion in CHO-K1-Zellen gezeigt. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse sollte in der vorliegenden Arbeit die Antikörperproduktion in CHO-K1-Zellen mithilfe des Zwei-Minicircle-Systems validiert und verbessert werden. Weiterhin wurden die durch Minicircles vermittelte Langzeitexpression und die Etablierung der Minicircles als Episom untersucht. Die Generierung von Minicircle-DNA war bisher nur in kleinen Mengen und ungenügender Reinheit möglich. Aufgrund dessen wurde ein Verfahren zur Generierung von hochreiner Minicircle-DNA entwickelt.

#### **3.1. Validierung und Verbesserung des Zwei-Minicircle-Systems zur Produktion von rekombinanten Antikörpern**

Durch die Verwendung von Minicircles zur Produktion von rekombinanten Proteinen sollte es möglich sein, ohne Beeinflussung der Zelle durch Integration der Fremd-DNA eine Langzeitexpression zu erreichen. Weiterhin könnte durch die Etablierung von mehr als einer Minicircle-Kopie eine erhöhte Transgenexpression erreicht werden, sodass die Produktion von rekombinanten Proteinen gesteigert werden kann. Die Antikörperproduktion mithilfe von Minicircles konnte bereits in adhärent wachsenden CHO-K1-Zellen gezeigt werden (Masterarbeit R. Kandimalla, nicht veröffentlicht). Dabei enthielt ein Minicircle das Gen für die leichte IgG-Kette (LC) und ein weiterer Minicircle das Gen für die schwere IgG-Kette (HC). Die Minicircles enthielten jeweils zusätzlich das SAR E zur episomalen Etablierung in adhärennten CHO-K1-Zellen. Es konnte sowohl die episomale Etablierung dieser Minicircles als auch die Produktion von funktionellen Antikörpern gezeigt werden. In dieser Arbeit sollte dieses Zwei-Minicircle-System weiterentwickelt werden. Dazu wurde der von Broll *et al.* <sup>[68]</sup>

entwickelte Vektor pEPI-delCM18 verwendet. Dieser Vektor enthält das SAR M18, welches vom SAR E abgeleitet wurde. Mit dem SAR M18-Minicircle konnte eine höhere Etablierungsrate und Stabilität im Vergleich zum herkömmlichen pEPI-Vektor gezeigt werden.



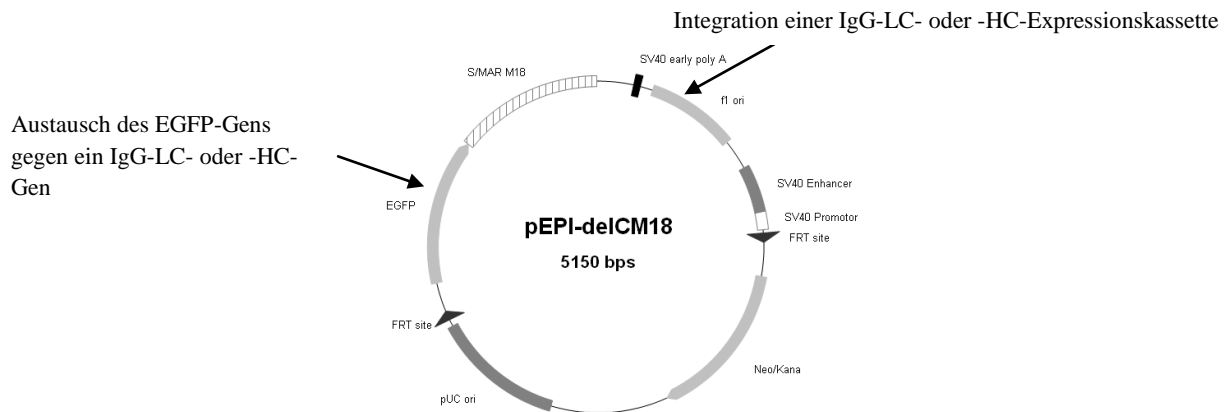
**Abbildung 12: Vektorkarte des Vektors pEPI-delCM18 und des entstehenden Minicircles pEPI-delCM18\_MC**

Dargestellt ist der Vektor pEPI-delCM18 und der entstehende Minicircle nach der Rekombination durch die FLP-Rekombinase in *E. coli*. Durch die Rekombination wurde die Neo/Kana-Expressionskassette und der pUC ori entfernt. Nach der Rekombination verbleibt eine Rekombinaseerkennungsstelle („FRT-site“) im Minicircle und der SV40-Promotor/Enhancer-Bereich liegt strangaufwärts des EGFP-Gens. Weiterhin enthält der Minicircle das SAR M18 und eine SV40-Polyadenylierungsstelle strangabwärts des EGFP-Gens. MC = Minicircle aus dem jeweiligen Vektor.

In bisherigen Untersuchungen wurde ein Minicircle mit dem Gen für die leichte IgG-Kette (LC) in Kombination mit dem EGFP („enhanced green fluorescent protein“)-Gen und ein weiterer Minicircle mit dem Gen für die schwere IgG-Kette (HC) in Kombination mit einem RFP („red fluorescent protein“)-Gen verwendet. Dabei wurde festgestellt, dass die gleichzeitige Expression von EGFP, RFP, IgG-LC und IgG-HC das Zellwachstum behindert bzw. die Zelle überlastet. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit ein neues System, welches nur noch mit einem Screeningmarker auskommt, untersucht werden. Dieses System beruht auf einer Selektion auf komplette, heterodimere Antikörper, d.h. nur die Zellklone, die beide IgG-Ketten exprimieren, überleben bzw. weisen gegenüber anderen Zellklonen einen Wachstumsvorteil auf. Weiterhin wurde eine Steigerung der Antikörperproduktion durch Promotoraustausch und Zusatz von transkriptionsfördernden Agenzien angestrebt.

### 3.1.1. Produktion des rekombinanten Antikörpers Trastuzumab (Herceptin®) in adhärenenten CHO-K1-Zellen

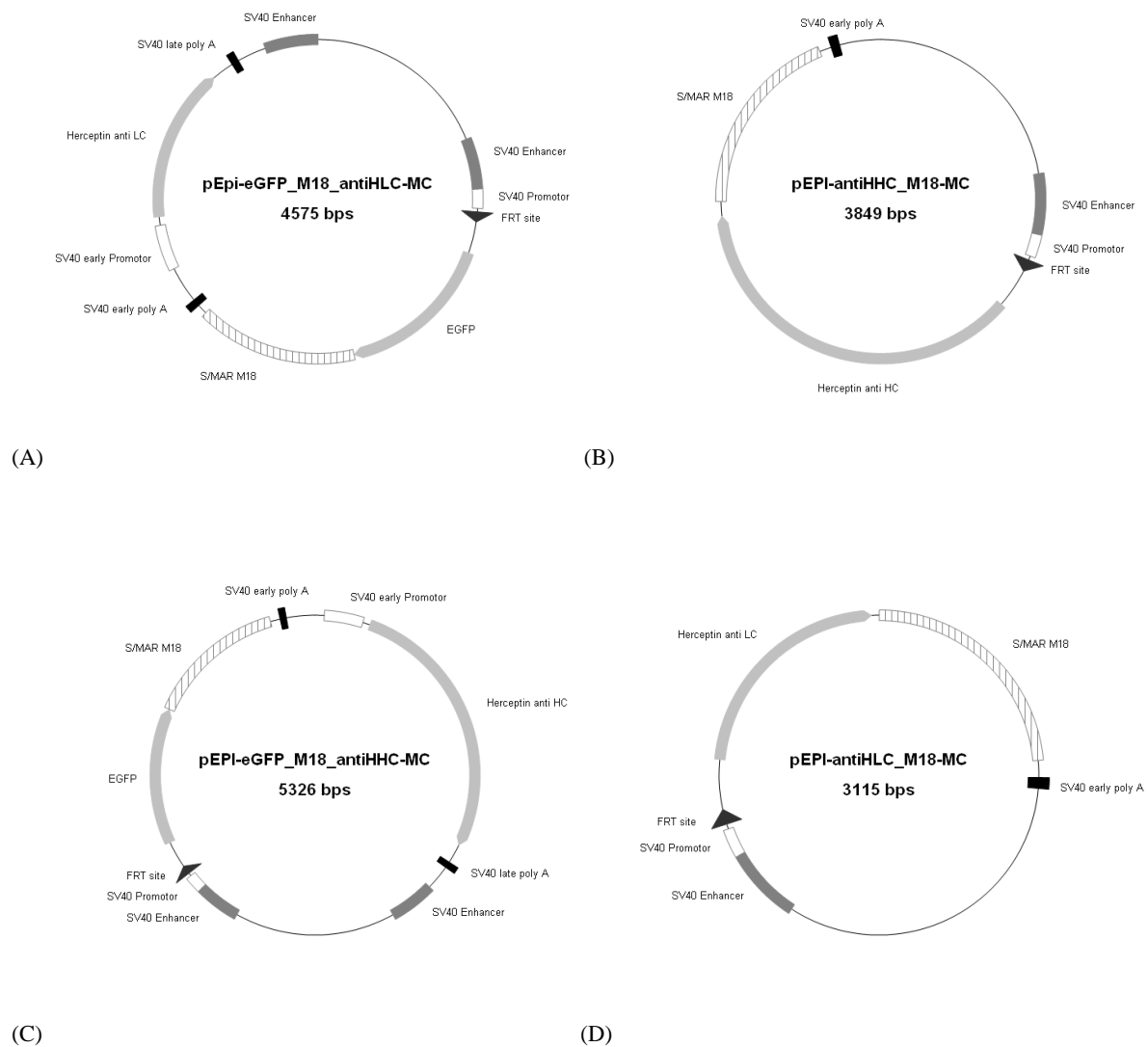
Für die Entwicklung des neuen Screening-Systems wurden das IgG-LC- und -HC-Gen in den Vektor pEPI-delCM18 kloniert. Die Gene wurden entweder gegen das EGFP des Vektors ausgetauscht oder als gesamte Expressionskassette zusätzlich zum EGFP in den Vektor kloniert (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Vektorkarte des zur Klonierung verwendeten Ausgangsvektors pEPI-delCM18**

Dargestellt sind der Vektor pEPI-delCM18 und die Orte der Integration bzw. des Austausches von IgG-Genen. Die Gene wurden entweder gegen das EGFP des Vektors ausgetauscht oder als gesamte Expressionskassette zusätzlich zum EGFP in den Vektor kloniert.

Aus den klonierten Vektoren entstanden durch Rekombination in *E. coli* die in Abbildung 14 dargestellten Minicircles.



**Abbildung 14: Vektorkarten der Minicircles zur Expression der leichten und schweren Kette der Herceptin-IgG-Moleküle**

Dargestellt sind die Minicircles, die nach der Rekombination durch die FLP-Rekombinase in *E. coli* aus dem jeweiligen Ursprungsvektor, basierend auf pEPI-delCM18, entstehen. Nach der Rekombination verbleibt eine Rekombinaseerkennungsstelle („FRT site“) im Minicircle. (A) In dem Vektor pEPI-eGFP\_M18\_antiHLC wurde strangabwärts der EGFP-S/MAR-Expressionskassette eine komplette Herceptin-LC-Expressionskassette, bestehend aus einem SV40-Promotor, dem IgG-LC-Gen, einem SV40-Enhancer und einer SV40-Polyadenylierungsstelle („SV40 early polyA“), kloniert. (B) In dem Vektor pEPI-antiHHC\_M18 wurde das EGFP-Gen gegen das Herceptin-HC-Gen ausgetauscht. (C) In dem Vektor pEPI-eGFP\_M18\_antiHHC wurde strangabwärts der EGFP-S/MAR-Expressionskassette eine komplette Herceptin-HC-Expressionskassette, bestehend aus einem SV40-Promotor, dem IgG-HC-Gen, einem SV40-Enhancer und einer SV40-Polyadenylierungsstelle („SV40 early poly A“), kloniert. (D) In dem Vektor pEPI-antiHLC\_M18 wurde das EGFP-Gen gegen das Herceptin-LC-Gen ausgetauscht. Es wurden der Vektor A zusammen mit B (Cotransfektion I) und der Vektor C zusammen mit D (Cotransfektion II) in adhärenzte CHO-K1-Zellen transfiziert. MC = Minicircle aus dem jeweiligen Vektor.

Die Minicircles wurden durch Lipofektion in adhärente CHO-K1-Zellen transfiziert (Tabelle 1). Dabei enthielt immer je ein Minicircle das EGFP-Gen als Screeningmarker. Die Cotransfektionen I und II stellen die beiden Möglichkeiten eines Coexpressionssystems zur Generierung von IgG-Molekülen dar. Bei Transfektion III wird nur das EGFP/HC-Konstrukt transfiziert, die Zellen können somit nur die IgG-HC produzieren. Bei der Transfektion IV können die Zellen hingegen nur die IgG-LC produzieren.

**Tabelle 1: Transfektion von adhärennten CHO-K1-Zellen zur Entwicklung eines Coexpressionssystems**

Transfektion	Konstrukt 1	Konstrukt 2
I	A (EGFP zusammen mit IgG-LC)	B (mit IgG-HC)
II	C (EGFP zusammen mit IgG-HC)	D (mit IgG-LC)
III	C (EGFP zusammen mit IgG-HC)	---
IV	A (EGFP zusammen mit IgG-LC)	---

Es wurden jeweils  $\sim 1,2 \times 10^5$  Zellen mit 16 fmol Minicircle pro Konstrukt transfiziert. Die Bezeichnung der Konstrukte erfolgte gemäß Abbildung 14.

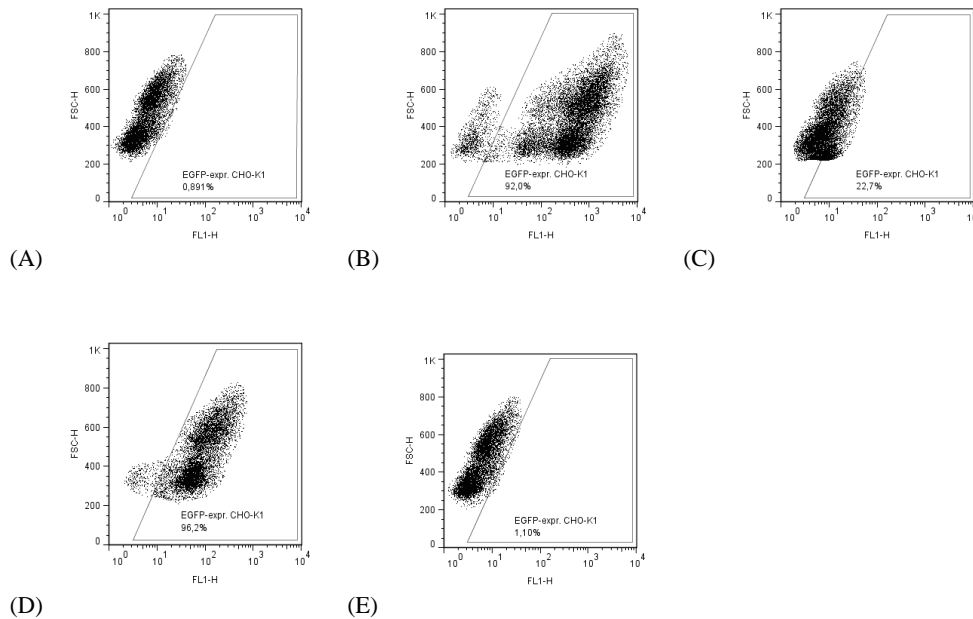
Die Transfektionseffizienz wurde in allen Fällen mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops auf 10 % bestimmt. Die EGFP-exprimierenden Zellen wurden 4 Tage nach der Transfektion („*days post-transfection*“, dpt) mittels Durchflusszytometrie (FACS, „*fluorescence activated cell sorting*“) angereichert bzw. sortiert (1. Sortierung). Bei den EGFP-exprimierenden Zellen der Transfektion III konnte nach der 1. Sortierung keine Proliferation beobachtet werden, ein großer Teil der Zellen starb ab. Wie erwartet, sammelt sich also, ohne das IgG-LC-Molekül, das IgG-HC-Molekül im ER an und stört damit die normale zelluläre Protein-Prozessierung. Die EGFP-exprimierenden Zellen der Transfektion IV zeigten dagegen eine normale Proliferationsrate, sodass auch in diesem Fall die Erwartung bestätigt wird, dass das IgG-LC-Molekül allein die zellulären Prozesse nicht stört. Die proliferierenden Zellen der Cotransfektionen I und II wurden 14 dpt erneut mittels FACS in EGFP-exprimierende und -nichtexprimierende Zellen geteilt (2. Sortierung). 11 dpt und 21 dpt wurde die IgG-Produktion der Zellen bestimmt. 21 dpt wurde zusätzlich die EGFP-Expression der Zellen bestimmt. Die IgG- und EGFP-Expression der resultierenden CHO-K1-Zellen sind in Tabelle 2 und Abbildung 15 dargestellt.

**Tabelle 2: IgG-Produktion und EGFP-Expression von adhärenenten rekombinanten CHO-K1-Zellen nach Transfektion mit unterschiedlichen Coexpressionssystemen und FACSSortierung**

Ansatz	$\text{pcd}_{\text{IgG}} \pm \sigma$	Anteil EGFP-exprimierender Zellen [%]	Mittlere EGFP-Expression [light units]
I 1. sort +	n.d.	n.a.	n.a.
I 2. sort +	$0,02 \pm 0,00$	92,00	711,00
I 2. sort -	n.d.	22,70	10,30
II 1. sort +	n.d.	n.a.	n.a.
II 2. sort +	$0,06 \pm 0,00$	96,20	111,00
II 2. sort -	n.d.	1,10	7,65

Die Antikörperproduktion wurde durch ELISAssay (s. Material und Methoden) und die EGFP-Expression durch FACS bestimmt. I und II = s. Tabelle 1; 1.sort+ = 1x sortierte, EGFP-exprimierende Zellen; 2.sort+ = 2x sortierte, EGFP-exprimierende Zellen; 2.sort- = 1x sortierte, EGFP-exprimierende Zellen, die bei der 2. Sortierung keine EGFP-Expression aufwiesen;  $\text{pcd}$  =  $\text{pg}_{\text{IgG}}$  pro Zelle pro Tag (Berechnung: s. Material und Methoden);  $\sigma$  = Standardabweichung (Berechnung: s. Material und Methoden); n.a. = nicht gemessen; n.d. = nicht messbar ( $< 0,02$   $\text{pcd}$ ).

Die EGFP-nichtexprimierenden Zellen des Coexpressionssystems I (I 2.sort -) zeigen einen Anteil von 22,7 % an EGFP-exprimierenden Zellen (Tabelle 2). Im Dot-Plot (Abbildung 15, C) ist jedoch zu erkennen, dass in diesem Fall keine deutlich abgegrenzte EGFP-exprimierende Zellpopulation vorhanden ist, sondern die EGFP-nichtexprimierenden Zellen insgesamt eine höhere Fluoreszenz aufweisen, sodass diese als „falsch-positiv“ zu werten sind. Obwohl die mittlere EGFP-Expression des Klongemisches der Cotransfektion I (Minicircle: „A“ + „B“, Abbildung 14) im Vergleich zu II nach der 2. Sortierung  $6,4\times$  höher ist, produzieren diese Zellen  $3,0\times$  weniger Herceptin-IgG als die Zellen der Cotransfektion II (Minicircle: „C“ + „D“, Abbildung 14). Dies bedeutet, dass das Klongemisch I, im Vergleich zu II, zwar mehr EGFP, jedoch weniger IgG-Moleküle produziert.



**Abbildung 15: EGFP-Expression von 2x sortierten adhärennten CHO-K1-Zellen bei Verwendung unterschiedlicher Coexpressionssysteme**

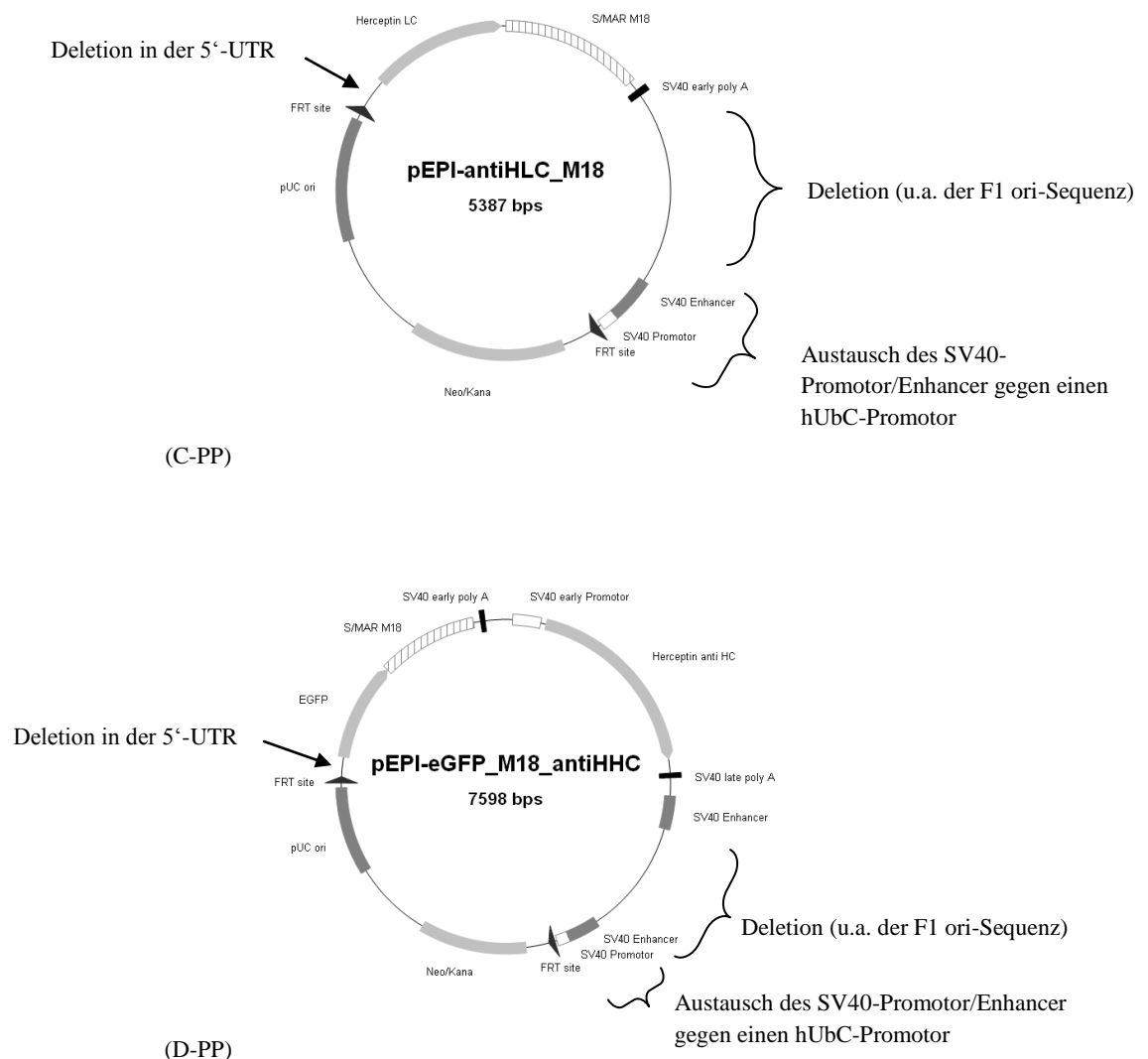
Die Expression von nicht-transfizierten CHO-K1-Zellen und den 2x sortierten Klongemischen der Cotransfektionen I und II ist als Dot-Plot-Auftragung dargestellt. (A) CHO-K1-Wildtyp-Kontrolle, (B) I 2.sort +, (C) I 2.sort-, (D) II 2.sort+, (E) II 2.sort-. FSC-H = Zellgröße, FL1-H = Fluoreszenz. Die Prozentzahl im Dot-Plot bezieht sich auf die Zellen im trapezförmigen Fenster, s. auch Tabelle 2 für quantitative Auswertung.

Da die IgG-LC eine Chaperonfunktion beim Zusammenbau des Antikörpers im ER übernimmt und für das Überleben einer IgG-HC-exprimierenden Zelle nötig ist, muss nur auf das Vorhandensein des IgG-HC-Minircircles sortiert werden. Daher wurde für weiterführende Untersuchungen das Coexpressionssystem II verwendet.

### 3.1.2. Steigerung der Expression durch Austausch der Promotoren und Deletion von Vektorsequenzen

Nach der Entwicklung des Minircircle-Coexpressionssystems II (s. 3.1.1.) mit dem Screeningmarker EGFP sollte untersucht werden, ob die Antikörper-Produktivität der adhärennten CHO-K1-Zellen erhöht werden kann. Die Produktivität der Klongemische lag bisher bei 0,06 pcd. Zur Optimierung der Antikörper-Produktion sollten die verwendeten Minircircles weiter verkürzt werden und außerdem anstatt des SV40-Promotors vor den Antikörpergenen ein humaner UbiquitinC (hUbC)-Promotor getestet werden. Darüber hinaus sollten zur definierten Bestimmung des episomalen Zustandes und der IgG-Produktionsleistung IgG-produzierende Einzelklone generiert werden.

Die transkribierte mRNA der Minicircles des Coexpressionssystems II enthält eine 220 bp 5'-nichttranslatierte Region („5'-*untranslated region*“, 5'-UTR) mit 2 AUG-Codons strangaufwärts des EGFP- bzw. IgG-LC-Gens. Zudem enthalten die Vektoren einen F1-Replikationsursprung (F1-ori), der für die Funktion der generierten Minicircles in der Zelle nicht von Bedeutung ist und die Minicircles damit unnötig vergrößert. Zur Vektoroptimierung wurden diese beiden Bereiche deletiert. Zusätzlich wurde der hUbC-Promotor strangaufwärts des jeweiligen IgG-Gens kloniert (Abbildung 16). Der Screeningmarker EGFP blieb dabei unter der Kontrolle des schwachen SV40 Promotors, um eventuelle Beeinträchtigungen der Zelle durch zu hohe EGFP-Mengen auszuschließen.



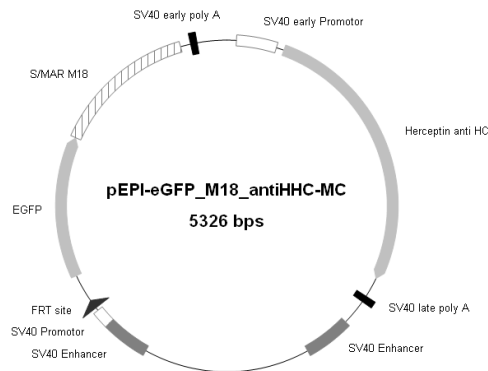
**Abbildung 16: Vektorkarte der zum Austausch des SV40-Promotors und der Optimierung verwendeten Ausgangsvektoren**

Dargestellt sind die beiden Ausgangsvektoren des Coexpressionssystems II. Es sind jeweils die Orte der Deletion des F1-ori und der genannten 5'-UTR kenntlich gemacht. Außerdem ist der Ort des Austausches des SV40-Promotor/Enhancer gegen

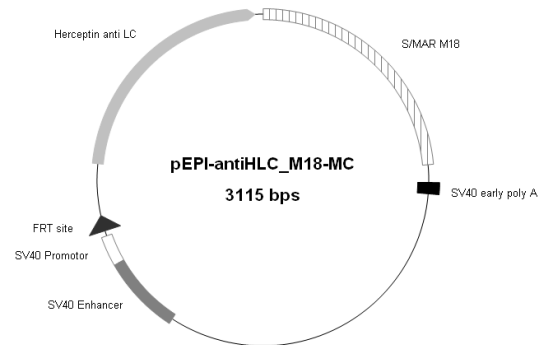


den hUbc-Promotor dargestellt. PP = Parentalplasmid (= Ausgangsvektor zur Generierung von Minicircles durch Rekombination in *E. coli*).

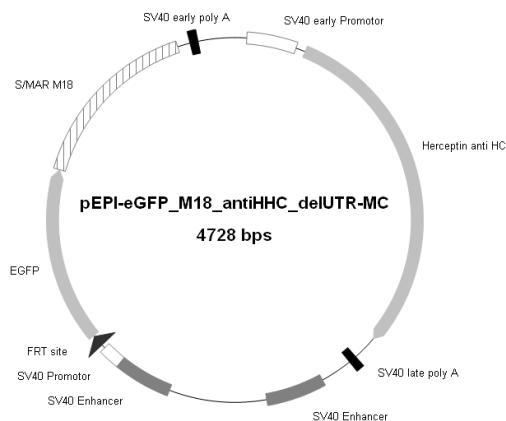
Nach dem Austausch des SV40-Promotor/Enhancer und der Optimierung der Vektoren wurden aus den entstandenen Vektoren die entsprechenden Minicircles durch Rekombination in *E. coli* generiert (Abbildung 17).



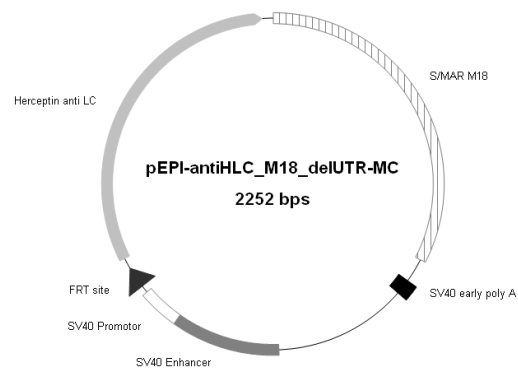
(C)



(D)

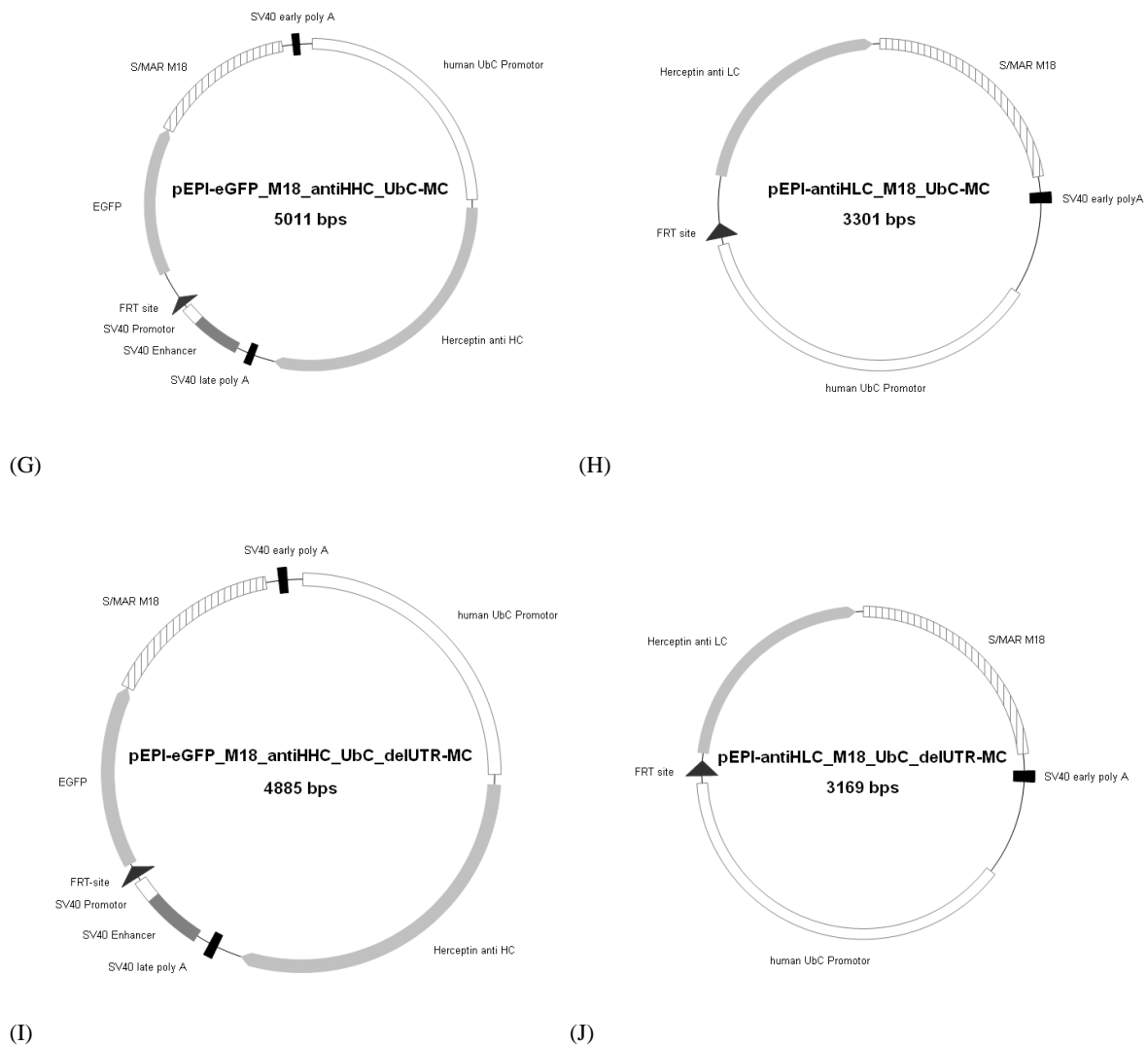


(E)



(F)

(Abbildungsbeschreibung auf der folgenden Seite)



**Abbildung 17: Vektorkarten der generierten Minicircles des Coexpressionssystem II nach der Optimierung und dem Promotoraustausch**

(C) Der Minicircle enthält strangabwärts der EGFP-S/MAR-Expressionskassette eine komplette IgG-HC-Expressionskassette, bestehend aus einem SV40-Promotor, dem IgG-HC-Gen, einem SV40-Enhancer und einer SV40-Polyadenylierungsstelle („SV40 early poly A“). (D) Der Minicircle enthält das IgG-LC-Gen strangaufwärts des S/MAR. (E) Der Minicircle enthält im Vergleich zum Minicircle „C“ eine verkürzte 5'-UTR strangaufwärts vom EGFP-Gen und eine Deletion des F1 ori strangabwärts des SV40 polyA-Signals. (F) Der Minicircle enthält im Vergleich zum Minicircle „D“ eine verkürzte 5'-UTR strangaufwärts vom EGFP-Gen und eine Deletion des F1 ori strangabwärts des SV40 polyA-Signals. (G) Der Minicircle enthält im Vergleich zum Minicircle „C“ einen hUbC-Promotor strangaufwärts des IgG-HC-Gens. (H) Der Minicircle enthält im Vergleich zum Minicircle „D“ einen hUbC-Promotor strangaufwärts des IgG-LC-Gens. (I) Der Minicircle enthält im Vergleich zum Minicircle „C“ eine verkürzte 5'-UTR strangaufwärts vom EGFP-Gen, eine Deletion des F1 ori strangabwärts des SV40 polyA-Signals und einen hUbC-Promotor strangaufwärts des IgG-HC-Gens. (J) Der Minicircle enthält im Vergleich zum Minicircle „D“ eine verkürzte 5'-UTR strangaufwärts vom EGFP-Gen, eine Deletion des F1 ori strangabwärts des SV40 polyA-Signals und einen hUbC-Promotor strangaufwärts des IgG-LC-Gens. MC = Minicircle aus dem jeweiligen Vektor.

Um die Auswirkungen der Optimierung der Minicircles und des Promotoraustausches sichtbar zu machen, wurden von jedem Minicircle des Coexpressionssystems II vier Varianten verwendet (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Transfektion von adhärenenten CHO-K1-Zellen zur Steigerung der IgG-Produktion**

Transfektion	Konstrukt 1	Konstrukt 2	
MH1	C	D	unverändert
MH2	E	F	Der F1 ori wurde deletiert und die 5'-UTR des EGFP-Gens verkürzt.
MH3	G	H	Der SV40-Promotor vor den Antikörpergenen wurde gegen den hUbc-Promotor ausgetauscht.
MH4	I	J	Der SV40-Promotor vor den Antikörpergenen wurde gegen den hUbc-Promotor ausgetauscht, der F1 ori deletiert und die 5'-UTR verkürzt.

Es wurden jeweils  $\sim 1,2 \times 10^5$  Zellen mit 150 fmol Minicircle pro Konstrukt transfiziert. Die Vektorkarten sind jeweils in Abbildung 17 dargestellt.

**Tabelle 4: Spezifische IgG-Produktivität und EGFP-Expression von adhärenenten CHO-K1-Zellen mit den unterschiedlichen Coexpressionssystemen**

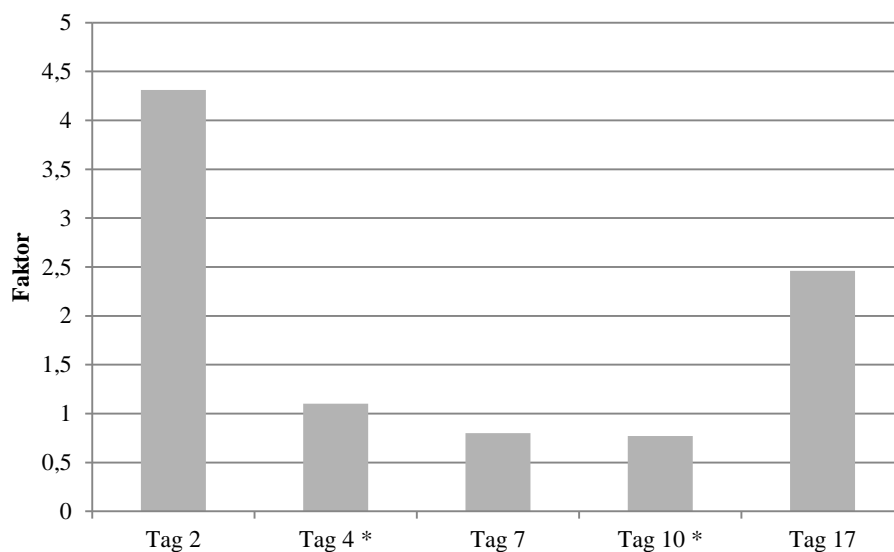
	2 dpt	4 dpt *	7 dpt	10 dpt *	17 dpt
Ansatz	$\text{pcd}_{\text{IgG}} \pm \sigma$	$\text{pcd}_{\text{IgG}} \pm \sigma$ (EGFP-expr. Zellen)	$\text{pcd}_{\text{IgG}} \pm \sigma$	$\text{pcd}_{\text{IgG}} \pm \sigma$ (EGFP-expr. Zellen)	$\text{pcd}_{\text{IgG}} \pm \sigma$
MH1	n.d.	n.d. (6,9 %)	n.d.	n.d. (3,1 %)	n.d.
MH2	n.d.	n.d. (2,1 %)	n.d.	n.d. (0,5 %)	n.d.
MH3	$0,14 \pm 0,00$	$0,05 \pm 0,00$ (5,9 %)	$0,02 \pm 0,00$	n.d. (1,6 %)	$0,13 \pm 0,04$
MH4	$0,59 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,00$ (5,9 %)	n.d.	n.d. (1,6 %)	$0,32 \pm 0,04$

Es wurden jeweils  $\sim 1,2 \times 10^5$  Zellen mit 150 fmol Minicircle pro Konstrukt transfiziert. Die Antikörperproduktion wurde durch ELISAssay (s. Material und Methoden) und die EGFP-Expression durch FACS bestimmt. Die Bestimmung der Antikörperproduktion 4 und 10 dpt erfolgte vor der Sortierung der Zellen durch FACS. Benennung der Coexpressionssysteme: s. Tabelle 3,  $\text{pcd} = \text{pg}_{\text{IgG}}$  pro Zelle pro Tag (Berechnung: s. Material und Methoden),  $\sigma$  = Standardabweichung (Berechnung: s. Material und Methoden); \* = Tag der Sortierung der EGFP-exprimierenden Zellen durch FACS; dpt = Tage nach der Transfektion („days post-transfection“); n.d. = nicht messbar ( $< 0,02 \text{ pcd}$ ).

Die Minicircles wurden in den in Tabelle 3 dargestellten Kombinationen in adhärenente CHO-K1-Zellen durch Lipofektion transfiziert. 2, 4, 7, 10 und 17 dpt wurde die IgG-Produktion durch ELISA bestimmt. 4 und 10 dpt wurden die EGFP-exprimierenden Zellen durch FACS selektiert, wobei 10 dpt zusätzlich zur Klongemisch-Selektion eine Einzelklonablage auf 96-Lochplatten erfolgte. Die IgG-Produktivität ist in Tabelle 4 dargestellt.

Die Zellpopulationen der Cotransfektionen MH1 und MH2 zeigten über den gesamten dargestellten Zeitraum eine IgG-Produktivität von  $< 0,02$  pcd. Die Zellpopulationen der Cotransfektionen MH3 und MH4 zeigten dagegen überwiegend eine IgG-Produktivität  $\geq 0,02$  pcd. Durch den hUbC-Promotor konnte also im Vergleich zum SV40-Promotor eine erhöhte IgG-Produktivität erreicht werden.

Durch Vergleich der IgG-Produktion der jeweils beiden Coexpressionssysteme mit dem hUbC-Promotor (MH3 und MH4) ist erkennbar, dass die Deletion der 5'-UTR und des F1-ori eine Erhöhung der IgG-Produktion (Faktor 2-4) in der frühen Phase nach der Transfektion (2 dpt) und in der stabilen Phase (17 dpt) hervorruft (Abbildung 18).



**Abbildung 18: Vergleich der IgG-Produktion in adhärenenten CHO-K1-Zellen (nach der Optimierung der Minicircles)**

Dargestellt ist die Steigerung der IgG-Produktion durch die Deletion des 5'-UTR strangaufwärts des EGFP- bzw. IgG-LC-Gens und des F1-ori strangabwärts des SV40 polyA-Signals in den jeweiligen Minicircles mit dem hUbC-Promotor im zeitlichen Verlauf (Daten s. Tabelle 4). \* = Tag der Selektion der EGFP-exprimierenden Zellen durch FACS.

Für die Einzelklonablage auf 96-Lochplatten durch FACS 14 dpt wurden die Zellen des Coexpressionssystems MH4 verwendet, da diese die höchste IgG-Produktivität zeigten (0,32 pcd). Diese wurden in „hoch“- und „mittel“-exprimierende Zellen eingeteilt. Als „hoch“-EGFP-exprimierende Zellen wurden die höchsten 3% der EGFP-exprimierenden Zellen

bestimmt. Dagegen wurden als „mittel“-EGFP-exprimierende Zellen die restlichen EGFP-exprimierenden Zellen bezeichnet. 44 „mittel“-EGFP-exprimierende Zellklone und 40 „hoch“-EGFP-exprimierende Zellklone konnten nach der Einzelzellklonierung weiterkultiviert werden. 29 dpt wurde die IgG-Produktion der Einzelzellklone bestimmt. In Tabelle 5 und Tabelle 6 sind jeweils die Einzelzellklone dargestellt, die eine IgG-Produktivität  $\geq 0,02$  pcd zeigten.

**Tabelle 5: Spezifische IgG-Produktivität der EGFP-„mittel“-exprimierenden Zellen (29 dpt)**

EGFP-exprimierende Einzelzellklone					
Einzelklon	pcd <sub>IgG</sub>	Einzelklon	pcd <sub>IgG</sub>	Einzelklon	pcd <sub>IgG</sub>
C9	5,42	D10	1,33	B9	0,45
A10	3,76	E12	0,77	A2	0,22
E10	2,05	A8	0,65		
A9	1,64	D6	0,47		

Die Einzelzellklonierung der Cotransfektion MH4 fand 10 dpt statt. Es wurden die restlichen EGFP-exprimierenden Zellen durch FACS sortiert, die nicht als „hoch“-EGFP-exprimierende Zellen sortiert wurden. 29 dpt wurde die IgG-Produktion durch ELISAssay (s. Material und Methoden) bestimmt. pcd = pg<sub>IgG</sub> pro Zelle pro Tag (Berechnung: s. Material und Methoden).

**Tabelle 6: IgG-Produktion der EGFP-„hoch“-exprimierenden Zellen (29 dpt)**

EGFP-exprimierende Einzelzellklone					
Einzelklon	pcd <sub>IgG</sub>	Einzelklon	pcd <sub>IgG</sub>	Einzelklon	pcd <sub>IgG</sub>
B8	18,29	C1	10,31	H10	1,89
E12	17,19	F2	4,92	B9	0,61
A1	14,41	B5	4,44	E3	0,46
C2	13,30	G3	3,43	D2	0,41
B6	12,62	A12	2,96	A3	0,03
D6	12,14	H2	2,38		

Die Einzelzellklonierung der Cotransfektion MH4 fand 10 dpt statt. Es wurden die höchsten 3% der EGFP-exprimierenden Zellen durch FACS sortiert. 29 dpt wurde die IgG-Produktion durch ELISAssay (s. Material und Methoden) bestimmt. pcd = pg<sub>IgG</sub> pro Zelle pro Tag (Berechnung: s. Material und Methoden).

Die Verteilung der IgG-Produktion der Einzelklone ist in Tabelle 7 dargestellt. In der vorliegenden Arbeit wurde eine IgG-Produktivität von 0,02-6 pcd als „niedrig“, von 6-10 pcd

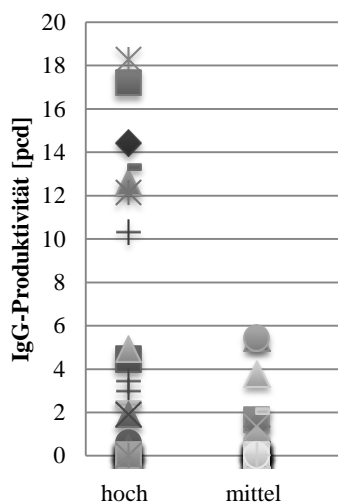
als „mittel“ und  $>10$  pcd als „hoch“ bezeichnet. Einzelzellklone mit einer IgG-Produktion  $<0,02$  pcd galten als nicht-exprimierende Einzelzellklone.

**Tabelle 7: Auswertung der IgG-Produktion der dargestellten Einzelklone (s. Tabelle 4 und Tabelle 6)**

„mittel“-EGFP-exprimierende Zellen	$>10$ pcd <sub>IgG</sub>	$>6-10$ pcd <sub>IgG</sub>	$\geq 0,02-6$ pcd <sub>IgG</sub>	$< 0,02$ pcd <sub>IgG</sub>
<b>Einzelklone</b>	0	0	10	34
<b>Anteil an allen „mittel“ Klonen [%]</b>	0,0	0,0	23,0	77,0
„hoch“-EGFP-exprimierende Zellen	$>10$ pcd <sub>IgG</sub>	$>6-10$ pcd <sub>IgG</sub>	$\geq 0,02$ pcd <sub>IgG</sub>	$< 0,02$ pcd <sub>IgG</sub>
<b>Einzelklone</b>	7	0	10	23
<b>Anteil an allen „hoch“ Klonen [%]</b>	17,5	0,0	25,0	57,5

pcd = pg<sub>IgG</sub> pro Zelle pro Tag (Berechnung: s. Material und Methoden); Anteil = Anteil der Einzelklone an allen untersuchten Einzelklonen.

Es wird deutlich, dass bei den sortierten EGFP-exprimierenden Einzelzellklonen 57,5-77,0 % keine IgG-Produktion zeigten. Weiterhin zeigte kein Zellklon eine IgG-Produktion von  $>6-10$  pcd. Dies ist anschaulich in Abbildung 19 dargestellt.

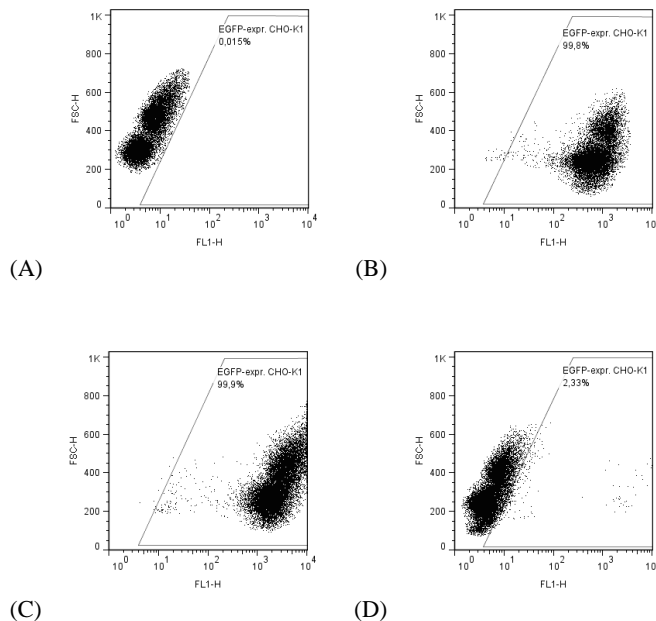


**Abbildung 19: Vergleich der IgG-Produktivität der CHO-K1-Zellklone aus Tabelle 5 und Tabelle 6**

Dargestellt sind die IgG-Produktivitäten der in Tabelle 5 und Tabelle 6 gezeigten Zellklone, pcd = pg<sub>IgG</sub> pro Zelle pro Tag, hoch = Zellklone, die bei der Selektion durch FACS  $>97$  % der höchsten, gemessenen EGFP-Expression aufwiesen, mittel = Zellklone, die bei der Selektion durch FACS  $<97$  % der höchsten, gemessenen EGFP-Expression aufwiesen.

Durch die Selektion von „hoch“-EGFP-exprimierenden Zellklonen konnten also ebenfalls Zellklonpopulationen mit einer hohen IgG-Expression angereichert werden. Jedoch betrug der Anteil an allen untersuchten Zellen nur 17,5 %. Da die „mittel“-EGFP-exprimierenden Einzelzellklone jedoch keinen Einzelzellklon aufwiesen, der eine hohe oder mittlere IgG-Produktivität ( $> 6$  pcd) zeigte, wird ebenfalls deutlich, dass nur durch die Sortierung von

Einzelzellklonen mit „hoher“ EGFP-Expression die Möglichkeit besteht, Einzelzellklone mit einer hohen IgG-Produktion ( $>10$  pcd) zu erhalten. Um diese Aussage genauer zu überprüfen, wurde von 18 Einzelklonpopulationen mit unterschiedlichen IgG-Expressionswerten die EGFP- mit der IgG-Expression verglichen. Als Beispiel für die unterschiedlichen EGFP-Expressionswerte sind in Abbildung 20 drei unterschiedliche Zellklonpopulationen in einer Dot-Plot-Darstellung gezeigt.



**Abbildung 20: EGFP-Expression der adhärennten CHO-K1-Zellklonpopulationen A1, C1 und C9**

Die Expression von nicht transfizierten CHO-K1-Zellen und den Einzelzellklonen ist als Dot-Plot gezeigt. Die EGFP-Expression der Cotransfektion MH4 wurde 46 dpt durch FACS bestimmt. (A) CHO-K1-Wildtyp-Kontrolle. (B) Zellklonpopulation A1 mit mittelstarker EGFP-Expression. (C) Zellklonpopulation C1 mit starker EGFP-Expression. (D) Zellklonpopulation C9 mit einem geringen Anteil an EGFP-exprimierenden Zellen, aber stark exprimierenden Zellen. FSC-H = Zellgröße, FL1-H = Fluoreszenz. Die Prozentzahl im Dot-Plot bezieht sich auf die Zellen im trapezförmigen Kasten.

Die Expressionsdaten zur Untersuchung der Korrelation der EGFP- mit der IgG-Expression (46 dpt) sind in Tabelle 8 dargestellt. Um die Entwicklung der IgG-Produktion zu verdeutlichen, sind zusätzlich die IgG-Produktionswerte 29 dpt aus Tabelle 6 dargestellt.

**Tabelle 8: Spezifische IgG-Produktivität und EGFP-Expression von 18 adhärennten CHO-K1-Zellklonpopulationen 29 und 46 dpt**

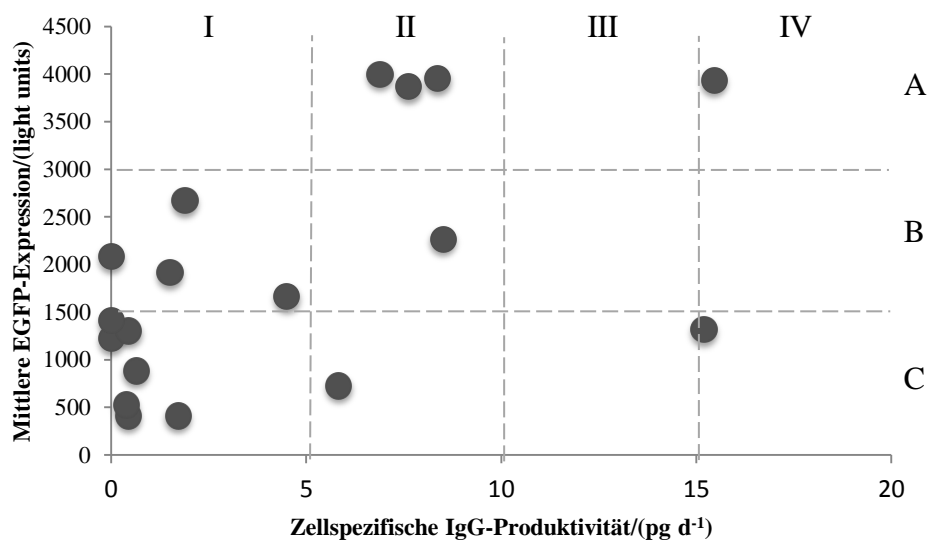
	29 dpt	46 dpt			29 dpt	46 dpt	
Einzelklon	pcd <sub>IgG</sub>	pcd <sub>IgG</sub> ± σ	Mittlere EGFP-Expression [light units] (Anteil expr. CHO-K1)	Einzelklon	pcd <sub>IgG</sub>	pcd <sub>IgG</sub> ± σ	Mittlere EGFP-Expression [light units] (Anteil expr. CHO-K1)
<b>B8</b>	18,29	15,20 ± 1,78	1315,88 (75,4 %)	<b>G3</b>	3,43	1,90 ± 0,18	2672,61 (11,2 %)
<b>E12</b>	17,19	8,37 ± 0,32	3953,16 (99,9 %)	<b>A12</b>	2,96	0,64 ± 0,20	880,05 (10,4 %)
<b>A1</b>	14,41	8,52 ± 2,17	2265,56 (99,9 %)	<b>H2</b>	2,38	1,73 ± 0,11	407,92 (16,5 %)
<b>C2</b>	13,31	6,89 ± 0,85	3995,77 (100 %)	<b>B9</b>	0,61	0,45 ± 0,08	408,38 (17,7 %)
<b>B6</b>	12,63	7,63 ± 1,79	3865,00 (100 %)	<b>E3</b>	0,46	0,45 ± 0,10	1300,38 (26,9 %)
<b>D6</b>	12,14	15,47 ± 0,92	3930,80 (99,8 %)	<b>D2</b>	0,41	0,40 ± 0,08	521,74 (2,2 %)
<b>C1</b>	10,31	5,84 ± 0,43	722,45 (99,8 %)	<b>B3</b>	n.d.	n.d.	2081,84 (99,7 %)
<b>F2</b>	4,92	1,51 ± 0,07	1914,80 (8,0 %)	<b>C9</b>	n.d.	n.d.	1221,75 (2,3 %)
<b>B5</b>	4,44	4,50 ± 0,84	1663,55 (100 %)	<b>F7</b>	n.d.	n.d.	1408,17 (99,8 %)

Die Einzelzellklonierung der Cotransfektion MH4 fand 10 dpt statt. Es wurden die höchsten 3% der EGFP-exprimierenden Zellen durch FACS sortiert (s. Tabelle 6). 29 und 46 dpt wurde die IgG-Produktion durch ELISAssay (s. Material und Methoden) bestimmt. 46 dpt wurde mittels FACS die EGFP-Expression gemessen. Die Prozentzahl bei der jeweiligen mittleren EGFP-Expression zeigt den Anteil EGFP-exprimierender Zellen. pcd = pg<sub>IgG</sub> pro Zelle pro Tag (Berechnung: s. Material und Methoden); σ = Standardabweichung (Berechnung: s. Material und Methoden); n.d. = nicht messbar (< 0,02 pcd).

Es ist zu erkennen, dass die IgG-Produktivität von Tag 29 pt zu Tag 46 pt bei den Zellklonpopulationen zum Teil geringfügig, zum Teil recht drastisch abgenommen hat. Die Abnahme nach 18-tägiger, selektionsfreier Kultivierung liegt zwischen 17 % (B8) und 78 % (A12). Die Zellklonpopulation „B5“ zeigt dagegen eine stabile IgG-Expression. Bei den Zellklonpopulationen, die 29 dpt keine IgG-Expression aufwiesen („B3“, „C9“, „F7“), konnte keine Steigerung der Expression beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass in diesen Zellklonpopulationen entweder ein stabiles „gene silencing“ oder ein kompletter Verlust der



Minicircles vorliegt. Die Zellklonpopulation „D6“ zeigte dagegen eine erhöhte IgG-Expression (127 %). Da es sich bei dem Screening um ein indirektes Verfahren handelt (EGFP-Expression wird als Maß für die IgG Produktion genommen) ist es interessant zu ermitteln, wie stark die Expression von EGFP und IgG gekoppelt sind. Zur besseren Untersuchung der Korrelation zwischen EGFP- und IgG-Produktivität der Einzelklone wurden die Expressionsdaten aus Tabelle 8 in Abbildung 21 graphisch als Dot-Plot dargestellt.

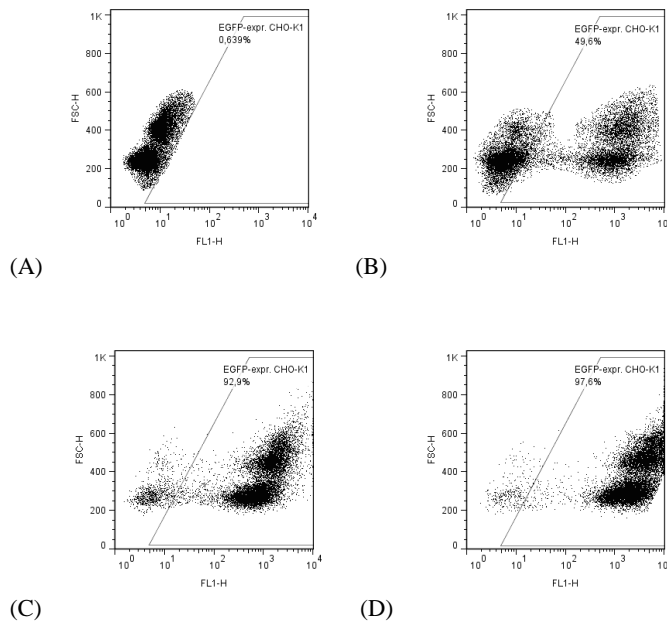


**Abbildung 21: Vergleich der IgG-Produktivität mit der EGFP-Expression von 18 CHO-K1-Zellklonen**

Dargestellt ist die mittlere EGFP-Expression gegen die IgG-Produktivität von den in Tabelle 8 gezeigten adhärennten CHO-K1-Zellklonpopulationen. Die Messung fand 46 dpt statt. Die IgG-Produktivität wurde durch ELISAssay und die EGFP-Expression durch FACS bestimmt. Die grau, gestrichelten Gitterlinien teilen den Dot-Blot in 12 Teile und dienen der besseren Veranschaulichung der Verteilung der verschiedenen Punkte.  $\text{pcd} = \text{pg}_{\text{IgG}}$  pro Zelle pro Tag (Berechnung: s. Material und Methoden).

Es ist eine starke Streuung der Datenpunkte zu erkennen, eine eindeutige Korrelation zwischen der IgG-Produktion und der EGFP-Expression liegt nicht vor.

Die Zellklonpopulation „B8“ (Abbildung 21 IV-C) zeigt eine geringe mittlere EGFP-Expression und eine hohe IgG-Produktion. Weiterhin zeigte diese Zellklonpopulation eine breite Verteilung der EGFP-Expression (s. Abbildung 22). Um zu untersuchen, ob sich diese Verteilung nach einer weiteren Sortierung der EGFP-exprimierenden Zellen erneut einstellt, wurden 60 dpt einerseits die höchsten 3 % der EGFP-exprimierenden Zellen („B8 hoch“) und andererseits die restlichen EGFP-exprimierenden Zellen („B8 mittel“) sortiert.



**Abbildung 22: EGFP-Expression des adhärennten CHO-K1-Zellklons B8 nach der 3. Sortierung**

Die Expression von nicht transfizierten CHO-K1-Zellen und den Zellklonpopulationen ist als Dot-Plot dargestellt. Die EGFP-Expression wurde 77 dpt durch FACS bestimmt. (A) CHO-K1-Wildtyp Kontrolle. (B) Zellklonpopulation „B8“, aus dem die Zellklonpopulationen „B8 hoch“ und „B8 mittel“ 60 dpt sortiert wurden. (C) Zellklonpopulation „B8 mittel“. Diese Zellklonpopulation besteht aus den restlichen EGFP-exprimierenden Zellen der Zellpopulation „B8“, die nicht zu „B8 hoch“ gehören. (D) Zellklonpopulation „B8 hoch“. Diese Zellklonpopulation besteht aus den höchsten 3 % der EGFP-exprimierenden Zellen der Zellklonpopulation „B8“. FSC-H = Zellgröße, FL1-H= Fluoreszenz. Die Prozentzahl im Dot-Plot bezieht sich auf die Zellen im trapezförmigen Kasten.

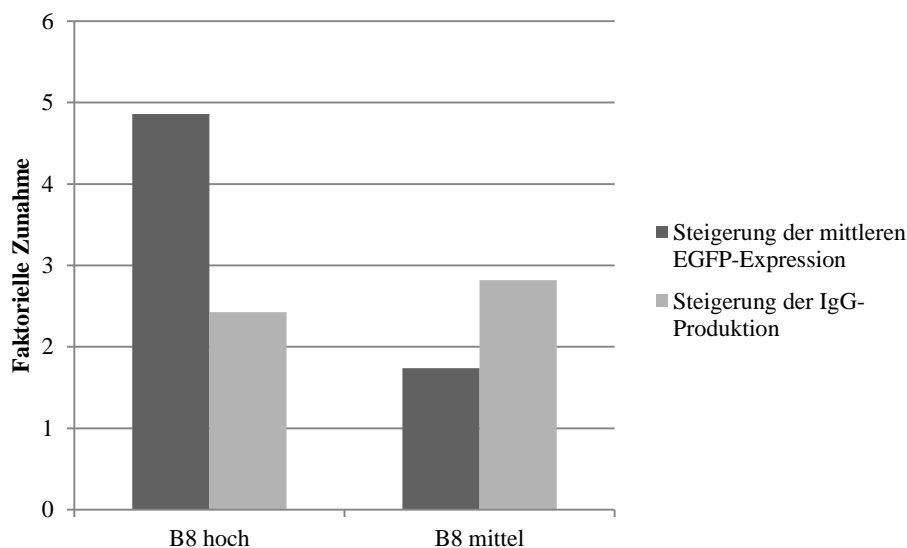
In den beiden Zellklonpopulationen „B8 hoch“ und „B8 mittel“ hat sich bereits 17 Tage nach der Sortierung erneut eine zusätzliche nicht-EGFP-exprimierende Zellklonpopulation gebildet. Trotzdem ist ein Unterschied zwischen den Zellklonpopulationen „B8 hoch“ und „B8 mittel“ bezüglich der Höhe der EGFP-Expression zu erkennen. Zur Untersuchung der Korrelation zwischen der IgG-Expression und der EGFP-Expression wurde zusätzlich die IgG-Produktivität bestimmt (Tabelle 9).

Die Zellklonpopulation „B8 hoch“ zeigt im Vergleich mit „B8 mittel“ zwar eine höhere EGFP-Expression, die IgG-Expression ist jedoch bei beiden Zellpopulationen nahezu gleich. Der Anteil der EGFP-exprimierenden Zellen bei den Zellklonpopulationen „B8 hoch“ und „B8 mittel“ ist 17 Tage nach der Sortierung bereits von 100 % auf 97,6 % bzw. 92,9 % gesunken, d.h. dass sich, wie bereits erwähnt, eine nicht-EGFP-exprimierende Zellpopulation gebildet hat. Es konnte also nach der 3. Sortierung keine stabile Zellklonpopulation erhalten werden. Die Auswirkungen der erneuten Selektion auf das Expressionsverhalten der beiden Zellklonpopulationen sind in Abbildung 23 dargestellt.

**Tabelle 9: IgG-Produktivität und EGFP-Expression der Zellklons „B8“, „B8 hoch“ und „B8 mittel“ (77 dpt)**

	$\text{pcd}_{\text{IgG}} \pm \sigma$	Mittlere EGFP-Expression [light units] (Anteil expr. CHO-K1)
<b>B8</b>	$6,22 \pm 1,28$	692 (49,6 %)
<b>B8 mittel</b>	$17,52 \pm 0,72$	1204 (92,9 %)
<b>B8 hoch</b>	$15,08 \pm 1,25$	3362 (97,6 %)

Die Einzelzellklonierung fand 10 Tage nach der Transfektion mittels FACS statt. Die Zellklone „B8 hoch“ und „B8 mittel“ wurden 60 dpt erneut auf ihre EGFP-Expression mittels FACS sortiert. Die Antikörperproduktion wurde durch ELISAssay (s. Material und Methoden) und die EGFP-Expression durch FACS (77 dpt) bestimmt. Die Prozentzahl bei der jeweiligen mittleren EGFP-Expression zeigt den Anteil EGFP-exprimierender Zellen.  $\text{pcd} = \text{pg}_{\text{IgG}}$  pro Zelle pro Tag (Berechnung: s. Material und Methoden);  $\sigma$  = Standardabweichung (Berechnung: s. Material und Methoden).

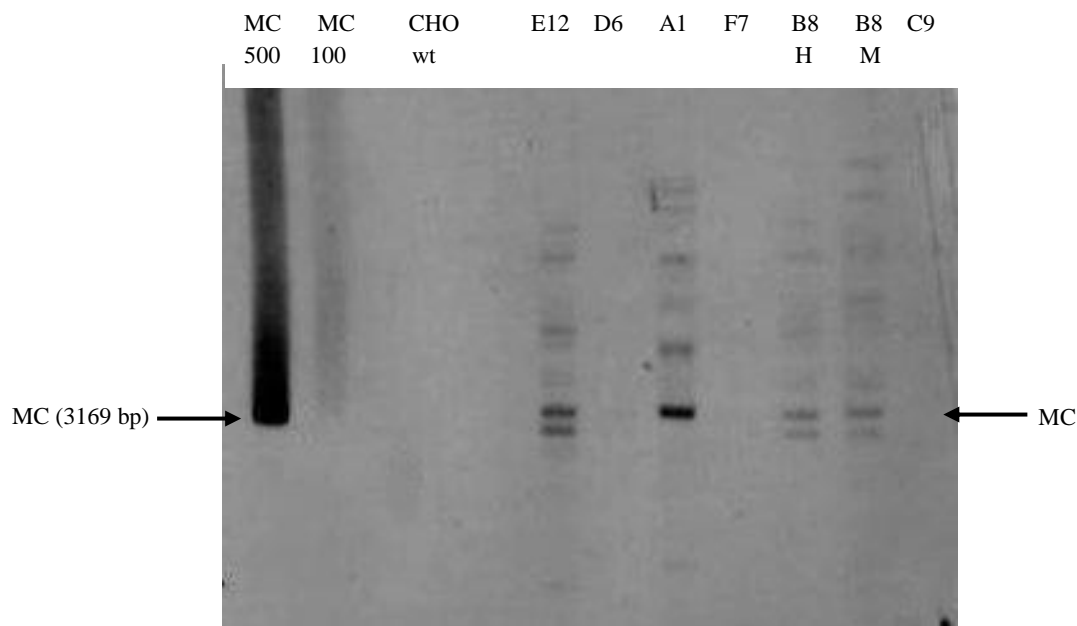
**Abbildung 23: Durch die Sortierung erreichte Steigerung der IgG- und EGFP-Expression von „B8 hoch“ und „B8 mittel“ im Vergleich zu „B8“**

Die EGFP-Expression und die IgG-Produktion (s. Tabelle 9) der Zellklonpopulationen „B8 hoch“ und „B8 mittel“ wurde jeweils durch die der Zellklonpopulation „B8“ dividiert, um die Steigerung zu bestimmen.

Bei der Zellklonpopulation „B8 hoch“ liegt, wie erwartet, die mittlere EGFP-Expression höher als bei „B8 mittel“, die IgG-Produktion liegt jedoch bei beiden Zellklonpopulationen im gleichen Bereich. Dies zeigt erneut, dass zwischen der mittleren EGFP- und der IgG-Expression keine Korrelation besteht.

Um den Status der Minicircles der Cotransfektion MH4 in unterschiedlich exprimierenden Zellklonpopulationen zu untersuchen, wurde mit der Gesamt-DNA der Zellklonpopulationen

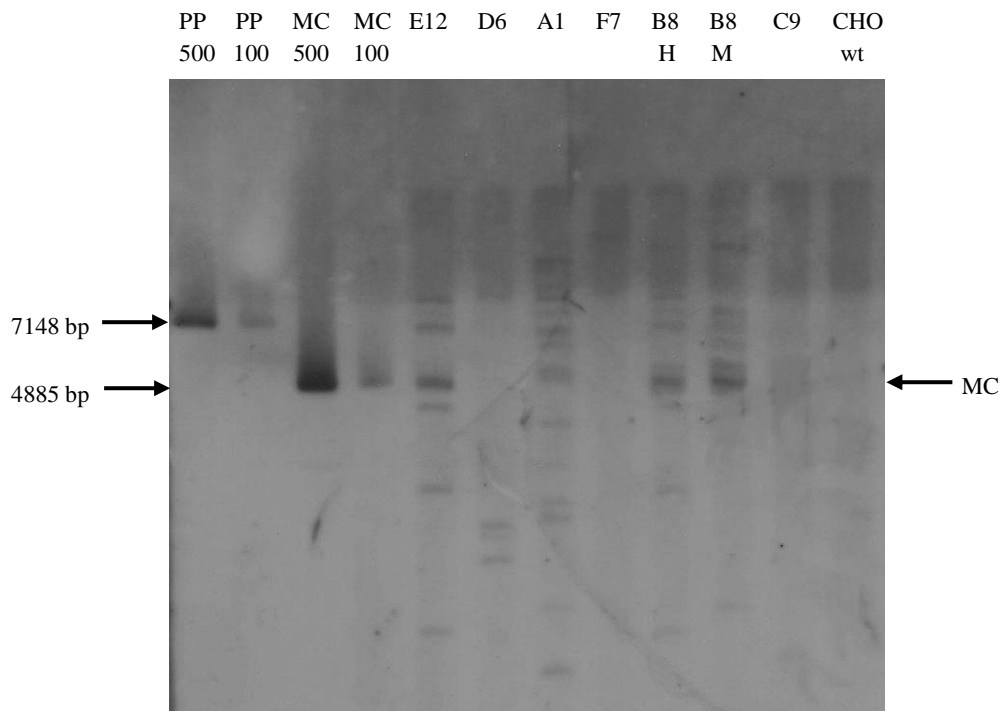
„A1“, „C9“, „D6“, „E12“ und „F7“ eine Southern Blot-Analyse durchgeführt. Weiterhin wurde ebenfalls die Gesamt-DNA der unterschiedlich IgG-exprimierenden Zellklonpopulationen „B8 hoch“ und „B8 mittel“ durch eine Southern Blot-Analyse untersucht. Dabei wurde der Status des Minicircles „J“ (Abbildung 24) und des Minicircles „I“ (Abbildung 25) getrennt voneinander untersucht.



**Abbildung 24: Southern Blot-Analyse (auf Minicircle „J“ mit der IgG-LC-Expressionskassette) der DNA aus rekombinanten adhärenen CHO-K1-Zellklonen**

10 µg der Gesamt-DNA des jeweiligen CHO-K1-Zellklons bzw. CHO-K1-Wildtyps wurde mit dem Restriktionsenzym *SpeI* geschnitten. Der Minicircle wurde dadurch linearisiert und die genomische DNA fragmentiert. Der Southern Blot wurde mit dem „AlkPhos Direct Labelling and Detection System mit CDP-Star“ von GE Healthcare durchgeführt. Für die Hybridisierung wurde eine LC-Sonde verwendet. Es wurde zur Bestimmung des Minicircles eine Kontrolle, bestehend aus CHO-Wildtyp-DNA und dem Minicircle „J“ (3169 bp), mitgeführt. MC 500 & 100 = CHO K1-Wildtyp-DNA + 500 bzw. 100 pg Minicircle-DNA, CHO wt = CHO K1-Wildtyp-DNA, E12 – C9 = Bezeichnung der jeweiligen Zellklone, B8 H + M = Zellklon B8 „hoch“ und B8 „mittel“, MC = episomaler Minicircle.

Der Minicircle „J“ (enthält IgG-LC-Gen) liegt in den Zellklonen „E12“, „D6“, „A1“, „B8 hoch“ und „B8 mittel“ episomal vor. Dabei ist bei der Zellklonpopulation D6 nur sehr wenig episomale DNA vorhanden, obwohl diese eine hohe IgG-Produktivität zeigt. Bei den Zellklonpopulationen „F7“ und „C9“ wurde weder episomale Minicircle-DNA noch integrierte Minicircle-DNA gefunden. Zusätzlich zu der episomalen DNA sind jeweils noch zusätzliche Banden zu erkennen, die auf eine Integration des Minicircles in die genomische DNA schließen lassen.



**Abbildung 25: Southern Blot Analyse (auf Minicircle „I“ mit der EGFP- und IgG-HC-Expressionskassette) der DNA aus rekombinanten adhärenen CHO-K1-Zellklonen**

10 µg der Gesamt-DNA der jeweiligen CHO-K1-Zellklonpopulation bzw. CHO-K1-Wildtyps wurde mit dem Restriktionsenzym AseI geschnitten. Der Minicircle wurde dadurch linearisiert und die genomische DNA fragmentiert. Der Southern Blot wurde mit dem „AlkPhos Direct Labelling and Detection System mit CDP-Star“ von GE Healthcare durchgeführt. Für die Hybridisierung wurde eine EGFP-Sonde verwendet. Es wurde zur Bestimmung des Minicircles eine Kontrolle, bestehend aus CHO-Wildtyp-DNA und dem Vektor „I-PP“ (7148 bp) oder dem Minicircle „I“ (4885 bp), mitgeführt. PP 500 + 100 = CHO K1-Wildtyp-DNA + 500 bzw. 100 pg Vektor-DNA, MC 500 & 100 = CHO K1-Wildtyp-DNA + 500 bzw. 100 pg Minicircle-DNA, CHO wt = CHO K1-Wildtyp-DNA, E12 – C9 = Bezeichnung der jeweiligen Zellklone, B8 H + M = Zellklon B8 „hoch“ und B8 „mittel“, MC = episomaler Minicircle.

Der Minicircle „I“ (enthält EGFP- und IgG-HC-Gen) liegt ebenfalls in den Zellklonpopulationen „E12“, „B8 hoch“ und „B8 mittel“ episomal vor, allerdings sind auch unterschiedliche Integrationsereignisse detektierbar. Die Zellklonpopulationen „A1“, „D6“, „F7“ und „C9“ weisen in diesem Fall nur integrierte Minicircle „I“ auf. Die Klonpopulationen „B8 hoch“ und „B8 mittel“ zeigen auch bei dem Minicircle „I“ ein unterschiedliches DNA-Integrationsmuster, wodurch auch hier die unterschiedliche EGFP-Expression begründet werden kann.

Der Status der beiden Minicircles in den Zellklonpopulationen wurde in Tabelle 10 anschaulich dargestellt.

**Tabelle 10: Status der Minicircles „I“ und „J“ in den untersuchten Zellklonpopulationen und die jeweiligen Expressionswerte**

	MC „I“		MC „J“		$\text{pcd}_{\text{IgG}} \pm \sigma$	Mittlere EGFP-Expression [light units] Anteil expr. Zellen
	episomal	integriert	episomal	integriert		
<b>E12</b>	+	+	+	+	$8,37 \pm 0,32$	3953,16 (99,9 %)
<b>D6</b>	-	+	+	+	$15,47 \pm 0,92$	3930,80 (99,8 %)
<b>A1</b>	-	+	+	+	$8,52 \pm 2,17$	2265,56 (99,9 %)
<b>F7</b>	-	+	-	-	n.d.	1408,17 (99,8 %)
<b>B 8 hoch</b>	+	+	+	+	$15,08 \pm 1,25$	3362,00 (97,6 %)
<b>B8 mittel</b>	+	+	+	+	$17,52 \pm 0,72$	1204,00 (92,9 %)
<b>C9</b>	-	+	-	-	n.d.	1221,75 (2,3 %)

Der Status der Minicircles wurde der Abbildung 24 und der Abbildung 25 entnommen. Der Minicircle „I“ enthält eine EGFP- und eine IgG-HC-Expressionskassette, der Minicircle „J“ enthält eine IgG-LC-Expressionskassette. Weiterhin ist die IgG-Produktivität und die EGFP-Expression der jeweiligen Zellklonpopulation aus Tabelle 8 und Tabelle 9 angegeben.  $\text{pcd}$  =  $\text{pg}_{\text{IgG}}$  pro Zelle pro Tag (Berechnung: s. Material und Methoden);  $\sigma$  = Standardabweichung (Berechnung: s. Material und Methoden).

Die beiden Minicircles liegen also in den untersuchten Zellklonpopulationen entweder als Episom und als Integrat oder nur als Integrat vor. Das Vorliegen von ausschließlich episomaler Minicircle-DNA konnte nicht beobachtet werden. Durch das Fehlen des Minicircles „J“ können in den Zellklonpopulationen „F7“ und „C9“ keine funktionellen IgG-Moleküle entstehen.

### 3.1.3. Steigerung der Expression durch die Agenzien Natriumbutyrat, Valproat und AzaC

Um die Expression der Zellklone zu steigern bzw. eventuelle „*gene silencing*“-Effekte zu unterdrücken, sollten die Agenzien Natriumbutyrat, Valproat und 5'-Azacytidin (AzaC) verwendet werden. Natriumbutyrat induziert über die nicht-kompetitive und reversible Hemmung von Histondeacetylasen (HDACs) eine Histonacetylierung der Histone H3 und H4 und führt somit zur Auflockerung des Chromatins, zur Aktivierung von bestimmten Genen

und zur Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase. Valproat inhibiert die Histon-Deacetylase, so dass es zu einer Histon-Hyperacetylierung kommt. Weiterhin aktiviert Valproat die Expression von diversen endogenen und exogenen Promotoren. AzaC bewirkt eine Demethylierung der genomischen DNA und damit eine Inhibierung des „*gene-silencing*“. Es wurde jedoch ebenfalls ein gewisses Potential zur Induktion der transgenspezifischen DNA-Methylierung beschrieben.

Durch Behandlung der IgG-produzierenden Zellklonpopulationen „A1“, „D6“ und „E12“ mit den Agenzien wurde untersucht, ob die IgG-Produktion gesteigert werden kann. Außerdem wurde durch Verwendung der Zellklonpopulation B8, deren IgG-Produktivität von 18,29 pcd (29 dpt) auf < 0,02 pcd (90 dpt) gesunken war, untersucht, ob die IgG-Produktion wieder angeregt werden kann. Die Zellen wurden jeweils für 48 h mit 5 mmol L<sup>-1</sup> Natriumbutyrat, 500 µmol L<sup>-1</sup> Valproat oder 24 µmol L<sup>-1</sup> AzaC inkubiert und im Anschluss die EGFP- und IgG-Expression der jeweiligen Klone gemessen (Tabelle 11 und Tabelle 12).

**Tabelle 11: IgG-Produktivität von 4 untersuchten CHO-K1-Zellklonen unter Zugabe unterschiedlicher Agenzien (90 dpt)**

	unbehandelt [pcd <sub>IgG</sub> ]	Natriumbutyrat [pcd <sub>IgG</sub> ]	AzaC [pcd <sub>IgG</sub> ]	Valproat [pcd <sub>IgG</sub> ]
<b>A1</b>	9,41	12,19	9,99	17,36
<b>B8</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>D6</b>	1,13	2,27	0,35	2,46
<b>E12</b>	7,79	13,08	4,27	17,48

Die Einzelzellklonierung der Cotransfektion MH4 fand 10 dpt statt. 88 dpt wurden die Zellen mit HamF12-Nährmedium + 5 mmol L<sup>-1</sup> Natriumbutyrat, 500 µmol L<sup>-1</sup> Valproat oder 24 µmol L<sup>-1</sup> AzaC überschichtet und für 48 h inkubiert. 90 dpt wurde die Antikörperproduktion durch ELISAssay (s. Material und Methoden) bestimmt. pcd = pg<sub>IgG</sub> pro Zelle pro Tag (Berechnung: s. Material und Methoden).

Die IgG-Produktivität konnte durch die Behandlung mit Natriumbutyrat und Valproat bei den Zellklonpopulationen „A1“, „D6“ und „E12“ gesteigert werden. Die Steigerung durch Natriumbutyrat lag bei einem Faktor von 1,3-2,0 und durch Valproat bei 1,8-2,2. Die IgG-Produktion von „B8“ konnte durch Natriumbutyrat und Valproat nicht angeregt werden. Durch die Verwendung von AzaC bleibt die IgG-Produktivität bei den untersuchten Zellklonpopulationen unverändert oder nimmt, wie bei den beiden Zellklonpopulationen „D6“ und „E12“, sogar ab.

**Tabelle 12: EGFP-Expression der 4 untersuchten CHO-K1-Zellklone unter Zugabe unterschiedlicher Agenzien (90 dpt)**

	<b>unbehandelt</b> [light units] (Anteil expr. CHO-K1)	<b>Natriumbutyrat</b> [light units] (Anteil expr. CHO-K1)	<b>AzaC</b> [light units] (Anteil expr. CHO-K1)	<b>Valproat</b> [light units] (Anteil expr. CHO-K1)
<b>A1</b>	1009,20 (95,6 %)	6564,22 (95,2 %)	1466,77 (93,9 %)	2340,65 (96,0 %)
<b>B8</b>	698,13 (37,9 %)	2938,05 (38,7 %)	1067,81 (36,8 %)	1294,38 (38,2 %)
<b>D6</b>	1174,74 (99,3 %)	6440,73 (99,4 %)	1704,59 (99,4 %)	2380,47 (99,5 %)
<b>E12</b>	1973,55 (97,9 %)	8987,01 (99,0 %)	3316,84 (98,1 %)	5265,22 (99,0 %)

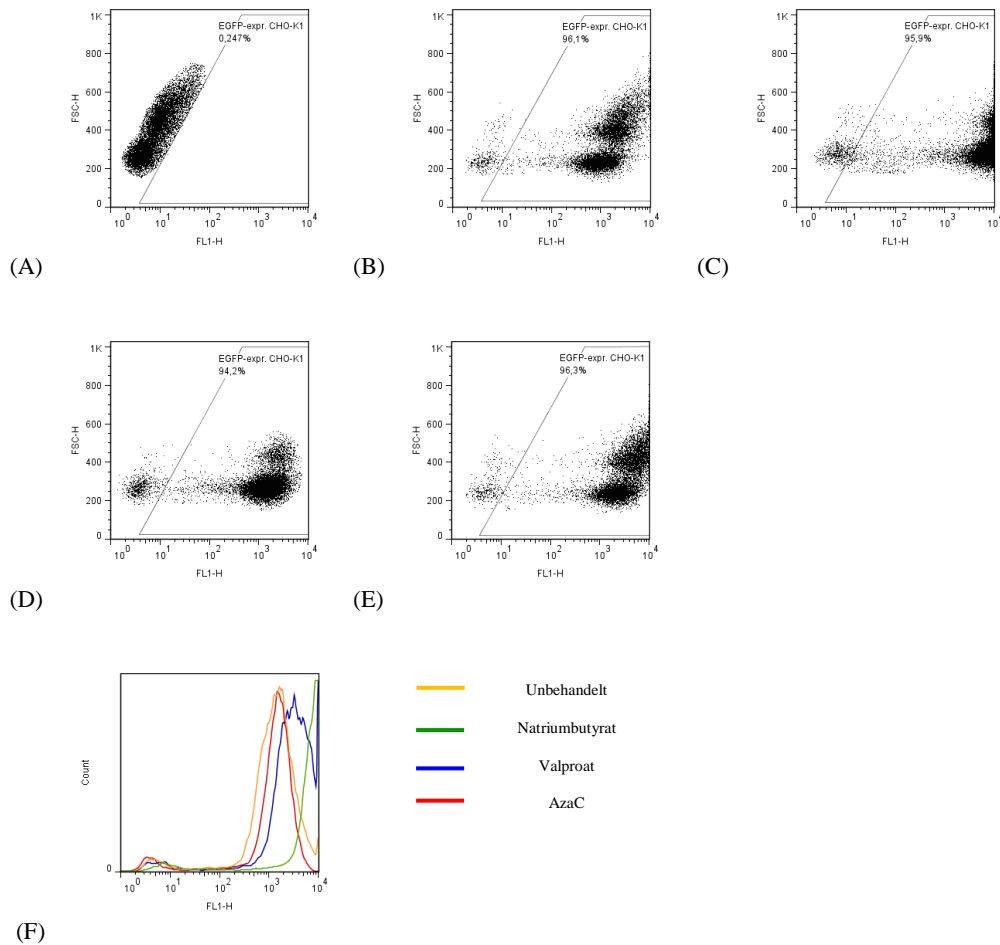
Die Einzelzellklonierung fand 10 dpt statt. 88 dpt wurden die Zellen mit HamF12-Kulturmedium + 5 mmol L<sup>-1</sup> Natriumbutyrat, 500 µmol L<sup>-1</sup> Valproat oder 24 µmol L<sup>-1</sup> AzaC überschichtet und für 48 h inkubiert. 90 dpt wurde die EGFP-Expression durch FACS bestimmt. Die Prozentzahl bei der jeweiligen mittleren EGFP-Expression zeigt den Anteil EGFP-exprimierender Zellen.

Der Anteil der EGFP-exprimierenden Zellen bleibt bei allen untersuchten Zellklonpopulationen, unabhängig vom verwendeten Agens, nahezu unverändert. Es konnten also keine nicht-EGFP-exprimierenden Zellen zur EGFP-Expression angeregt werden.

Durch die Behandlung der Zellpopulationen mit Natriumbutyrat konnte eine Steigerung der mittleren EGFP-Expression um einen Faktor von 4,2-6,5 beobachtet werden. Die Steigerung der mittleren EGFP-Expression durch Valproat lag bei 1,9-2,7. Durch die Behandlung der Zellklonpopulationen mit AzaC konnte die EGFP-Expression nur um den Faktor 1,5-1,7 gesteigert werden.

Zur Verdeutlichung des Einflusses der unterschiedlichen Agenzien sind in Abbildung 26 Histogramme und Dot-Plots der IgG- und EGFP-exprimierenden Zellklonpopulation „A1“ dargestellt.





**Abbildung 26: EGFP-Expression der adhärennten CHO-K1-Zellklonpopulation „A1“ nach der Behandlung mit Natriumbutyrat, AzaC und Valproat**

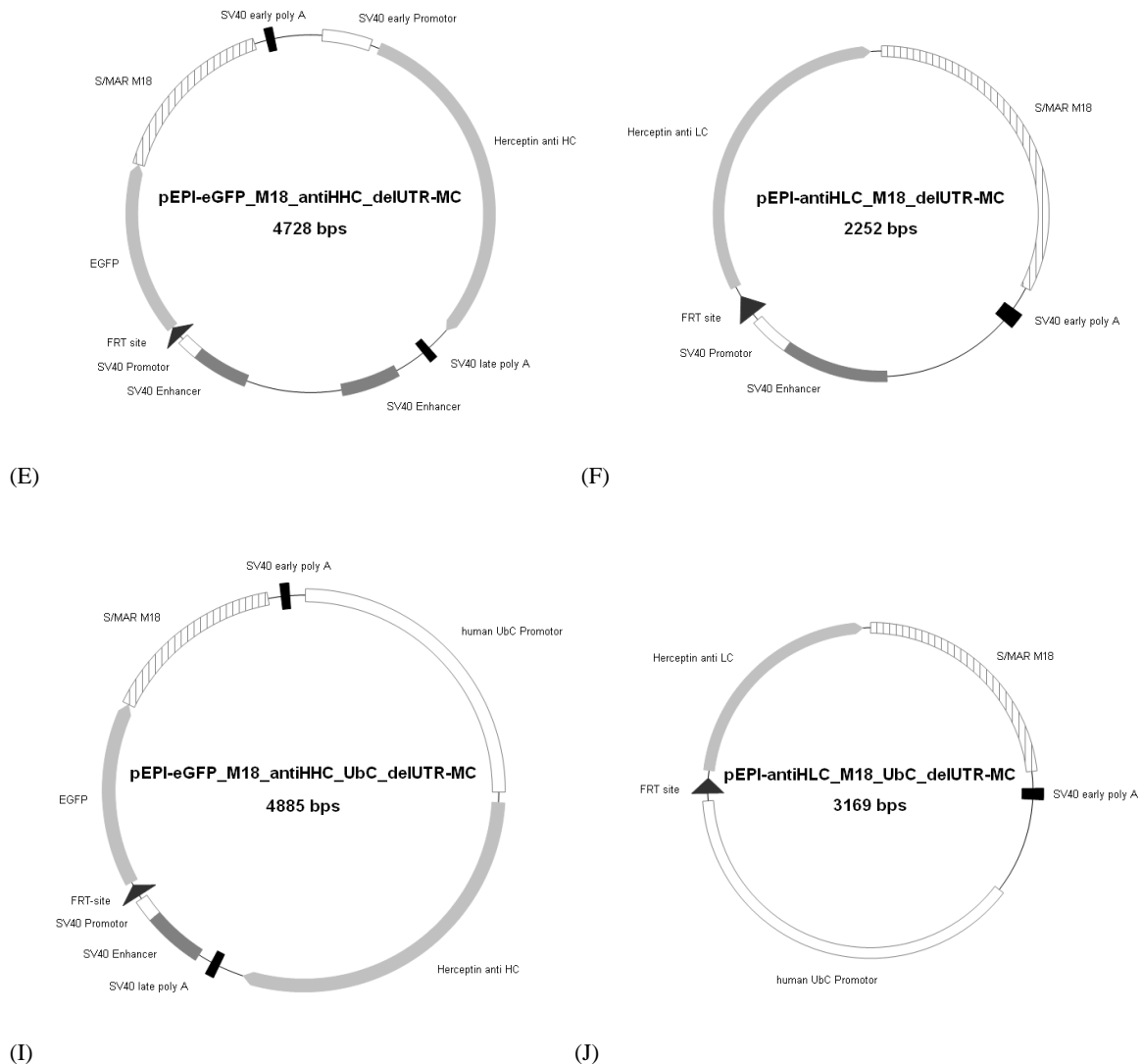
Die Expression von nicht transfizierten CHO-K1-Zellen und der Zellklonpopulation „A1“ ist als Dot-Plot und Histogramm dargestellt. Die EGFP-Expression wurde 90 dpt durch FACS bestimmt. (A) Dot-Plot der CHO-K1-Wildtyp-Kontrolle. (B) Dot-Plot der Zellklonpopulation „A1“. (C) Dot-Plot der Zellklonpopulation „A1“, die für 48 h mit 5 mmol L<sup>-1</sup> Natriumbutyrat behandelt wurde. (D) Dot-Plot der Zellklonpopulation „A1“, die für 48 h mit 24 μmol L<sup>-1</sup> AzaC inkubiert wurde. (E) Dot-Plot der Zellklonpopulation „A1“, die für 48 h mit 500 μmol L<sup>-1</sup> Valproat behandelt wurde. (F) Histogramm-Plot der unterschiedlich behandelten Zellpopulationen. FSC-H = Zellgröße, FL1-H = EGFP-Fluoreszenz. Die Prozentzahl im Dot-Plot bezieht sich auf die Zellen im trapezförmigen Kasten.

Wie bereits in Tabelle 12 dargestellt, bewirkt Natriumbutyrat eine sichtbare Steigerung der mittleren EGFP-Expression der exprimierenden Zellen. Durch Valproat kommt es zu einer leichten Steigerung der mittleren EGFP-Expression. AzaC bewirkt nur eine geringe Steigerung der mittleren EGFP-Expression.

### 3.1.4. Herstellung des rekombinanten Antikörpers Trastuzumab (Herceptin®) in CHO-K1-Suspensionszellen

Bisher wurde die Produktion von IgG-Molekülen mit Minicircle-DNA ausschließlich in adhärennten CHO-K1-Zellen gezeigt. Für die Produktion von rekombinanten Proteinen sind

jedoch Suspensionszellen vorzuziehen, da hohe Zelldichten erreicht werden können und die Kultivierung im großen Maßstab möglich ist. Deshalb wurden die Minicircles des Coexpressionssystems MH2 und MH4 in CHO-K1-Suspensionszellen transfiziert.



**Abbildung 27: Vektorkarten der Minicircles der Cotransfektion MH2 und MH4 zur Generierung von Herceptin-IgG-Molekülen**

Dargestellt sind die entstandenen Minicircles nach der Rekombination durch die FLP-Rekombinase in *E. coli*. Bei den Minicircles „E“ und „F“ (Cotransfektion MH2) liegen die IgG-Gene unter der Kontrolle eines SV40-Promotors vor. Die Minicircles „I“ und „J“ (Cotransfektion MH4) enthalten die IgG-Gene unter der Kontrolle eines hUbC-Promotors. MC = Minicircle aus dem jeweiligen Vektor.

Die Cotransfektion wurde jeweils mithilfe von Polyethylenimin (25 kDa PEI, linear) durchgeführt, da diese Transfektionsmethode, im Gegensatz zur Elektroporation, in Vorversuchen die höchste Transfektionseffizienz bei einem hohen Anteil an viablen Zellen nach der Transfektion zeigte (Daten nicht gezeigt). Es sollte der Einfluss der

unterschiedlichen Promotoren in den transfizierten CHO-K1-Suspensionszellen verglichen werden.

**Tabelle 13: Herceptin-IgG-Produktion von CHO-K1-Suspensionszellen mit zwei unterschiedlichen Coexpressionssystemen**

	2 dpt		4 dpt	
	Zellzahl (IgG-Moleküle [ng])	$\text{pcd}_{\text{IgG}} \pm \sigma$	Zellzahl (IgG-Moleküle [ng])	$\text{pcd}_{\text{IgG}} \pm \sigma$
MH2	$4,50 \times 10^5$ (9,72)	n.d.	$11,30 \times 10^5$ (3,34)	n.d.
MH4	$6,00 \times 10^5$ (288,46)	$0,24 \pm 0,03$	$15,20 \times 10^5$ (68,10)	$0,02 \pm 0,00$

Es wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen mit  $0,5 \mu\text{g}$  Minicircle pro Konstrukt transfiziert. Die Transfektion erfolgte mithilfe von PEI (25 kDa, linear) in einem Verhältnis PEI:DNA von 3:1. 2 dpt und 4 dpt wurden die Zellen in einer Fuchs-Rosendahl-Kammer gezählt und die IgG-Konzentration im zellfreien Medium durch ELISAssay (s. Material und Methoden) bestimmt. Verwendete Minicircle-DNA: s. Abbildung 27,  $\text{pcd} = \text{pg}_{\text{IgG}}$  pro Zelle pro Tag (Berechnung: s. Material und Methoden);  $\sigma$  = Standardabweichung (Berechnung: s. Material und Methoden); n.d. = nicht messbar ( $< 0,02 \text{ pcd}$ ).

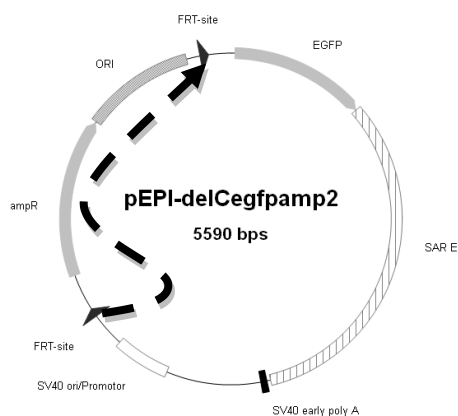
Die Zellpopulation der Cotransfektionen MH2 zeigte über den gesamten dargestellten Zeitraum eine IgG-Produktivität von  $< 0,02 \text{ pcd}$ . Die Zellpopulation der Cotransfektionen MH4 zeigte dagegen eine IgG-Produktivität  $\geq 0,02 \text{ pcd}$ . Durch den hUbC-Promotor konnte also im Vergleich zum SV40-Promotor eine erhöhte IgG-Produktivität erreicht werden. Die Expression konnte somit sowohl in adhärenen CHO-K1-Zellen als auch in CHO-K1-Suspensionszellen durch Verwendung des hUbC-Promotors gesteigert werden, wobei die IgG-Produktivität der adhärenen Zellen jeweils höher war.

### 3.2. Optimierung und Entwicklung von Verfahren zur Minicircle-DNA-Gewinnung

Die Generierung von Minicircle-DNA ohne prokaryotische Vektoranteile erfolgte bisher immer mittels Rekombination in einem geeigneten *E. coli*-Stamm, der durch eine Rekombinase in der Lage war, nach einer Induktion die gezielte Rekombination des Ausgangsvektors in Miniplasmid und Minicircle durchzuführen. Bisher wurden die Rekombinasen Cre-Rekombinase,  $\phi\text{C31}$  Rekombinase,  $\lambda$ -Integrase, Par-Resolvase und die FLP-Rekombinase verwendet. In dieser Arbeit wurden zwei Verfahren zur Induktion der Rekombination durch die FLP-Rekombinase untersucht. Als Alternative wurde ein Verfahren entwickelt, das ohne eine Rekombination in *E. coli* auskommt und die Erzeugung von Minicircle-DNA *in vitro* in sehr guter Qualität erlaubt.

### 3.2.1. Generierung durch Rekombination im *E. coli*-Stamm MM294, EL250 und TopTen FLPE

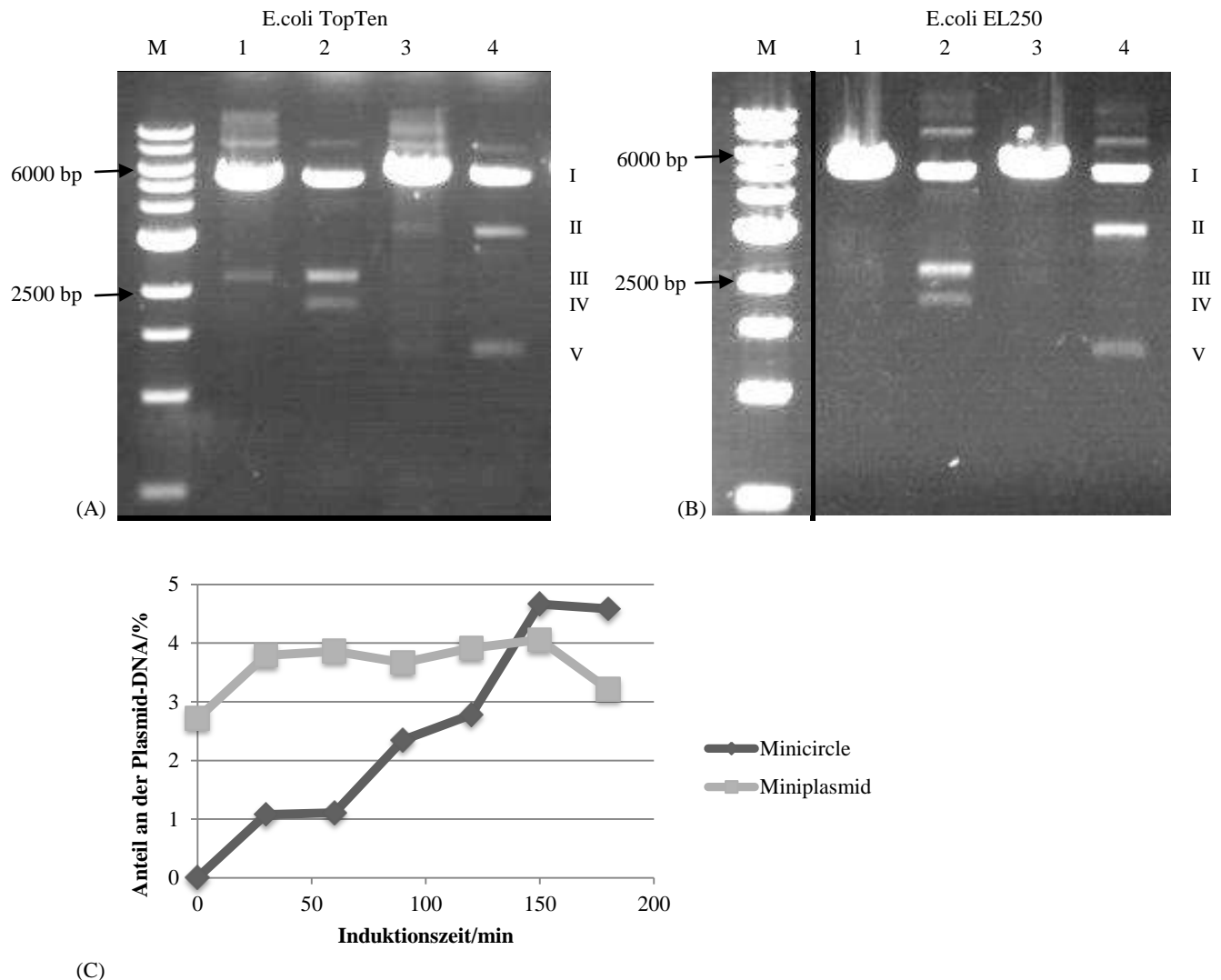
In Vorarbeiten wurde bisher zur Generierung der Minicircles ausschließlich ein thermisches Induktionsverfahren verwendet. Dazu wurde der *E. coli*-Stamm MM294 verwendet, bei dem ein im Genom integriertes FLP-Rekombinase-Gen unter der Kontrolle eines hitzeinduzierbaren Promotors steht. Die Verwendung einer Rekombinase garantiert dabei den Erhalt des superhelikalen Status der Minicircles, der für die weitere Verwendung als Vektor für die Transfektion eukaryotischer Zellen notwendig ist. Dieses Verfahren ist wegen des erforderlichen, schnellen Temperaturwechsels nur im kleinen Maßstab durchführbar, weiterhin ist der Arbeitsaufwand relativ hoch und die Ausbeute an Minicircle gering. Der Übergang auf chemische (hier: Arabinose-vermittelte) FLP-Rekombinase-Induktionsverfahren ist daher aus biotechnologischen Gesichtspunkten von Vorteil. Es wurden zwei unterschiedliche *E. coli*-Stämme, bei denen das, in das *E. coli*-Genom integrierte, FLP-Rekombinase-Gen unter der Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren Promotors steht, verwendet: „TopTen FLPE“ (AG Molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, HZI) und „EL250“ (Med.Hochschule Hannover, MHH).



**Abbildung 28: Schematische Darstellung des Vektors pEPI-delCegfpamp2 (Vektor „K“)**

Dargestellt ist der Vektor vor der Rekombination durch die FLP-Rekombinase in *E. coli*. Der Vektor enthält den prokaryotischen Bereich, bestehend aus dem Ampicillin-Resistenzgen („ampR“) und einem Replikationsursprung („ORI“), der durch zwei Rekombinaseerkennungsstellen („FRT-site“) vom eukaryotischen Teil des Vektors abgegrenzt wird. Der eukaryotische Bereich umfasst ein EGFP-Gen („EGFP“), das SAR E aus dem humanen Interferon  $\beta$ -Gencluster, eine SV40-Polyadenylierungsstelle („SV40 early poly A“) und einen SV40-Promotorbereich („SV40 ori/Promotor“). Nach der Rekombination in *E. coli* durch die FLP-Rekombinase (dargestellt durch eine gestrichelte Linie) gelangt der SV40-Promotor vor (5') das EGFP-Gen.

Für die Optimierung der L-Arabinose-Induktion wurde der Vektor pEpi-delCegfpamp2 („K“, EGFP-Gen, SAR E (2 kbp), 2x FRT-Rekombinaseerkennungsstellen, 5590 bp) verwendet (Abbildung 28).



**Abbildung 29: Plasmid-DNA („K“) in *E. coli* TopTen FLPE und *E. coli* EL250 vor und nach der Rekombination durch die FLP-Rekombinase**

Die Induktion der Rekombination erfolgte für 3 h mit 0,3 % L-Arabinose (w/v) in M9-Minimalmedium bei 30 °C (*E. coli* EL250) oder 37 °C (*E. coli* TopTen FLPE). Anschließend wurde die Plasmid-DNA aus den Zellen präpariert, in einem Restriktionsverdau in der Miniplasmid-Region (SpeI, Spalte 1 und 2) oder in der Minicircle-Region (BstZ17I, Spalte 3 und 4) linearisiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. (A) Rekombination in *E. coli* TopTen FLPE, (B) Rekombination in *E. coli* EL250, (C) Anteile der Miniplasmid- und Minicircle-DNA an der gesamten, präparierten Plasmid-DNA aus *E. coli* EL250 über die Zeit der L-Arabinose-Induktion. M = 1 kbp DNA-Leiter (lineare DNA), 1 = In der Miniplasmid-Region geschnittene Plasmid-DNA **vor** der Rekombination, 2 = In der Miniplasmid-Region geschnittene Plasmid-DNA **nach** der Rekombination, 3 = In der Minicircle-Region geschnittene Plasmid-DNA **vor** der Rekombination, 4 = In der Minicircle-Region geschnittene Plasmid-DNA **nach** der Rekombination, I = Ursprünglicher Vektor pEPI-delCegfpamp2 (linear), II = Minicircle (linear), III = Miniplasmid (linear), IV = Minicircle (ccc), V = Miniplasmid (ccc), ccc = „supercoiled“-Form der DNA.

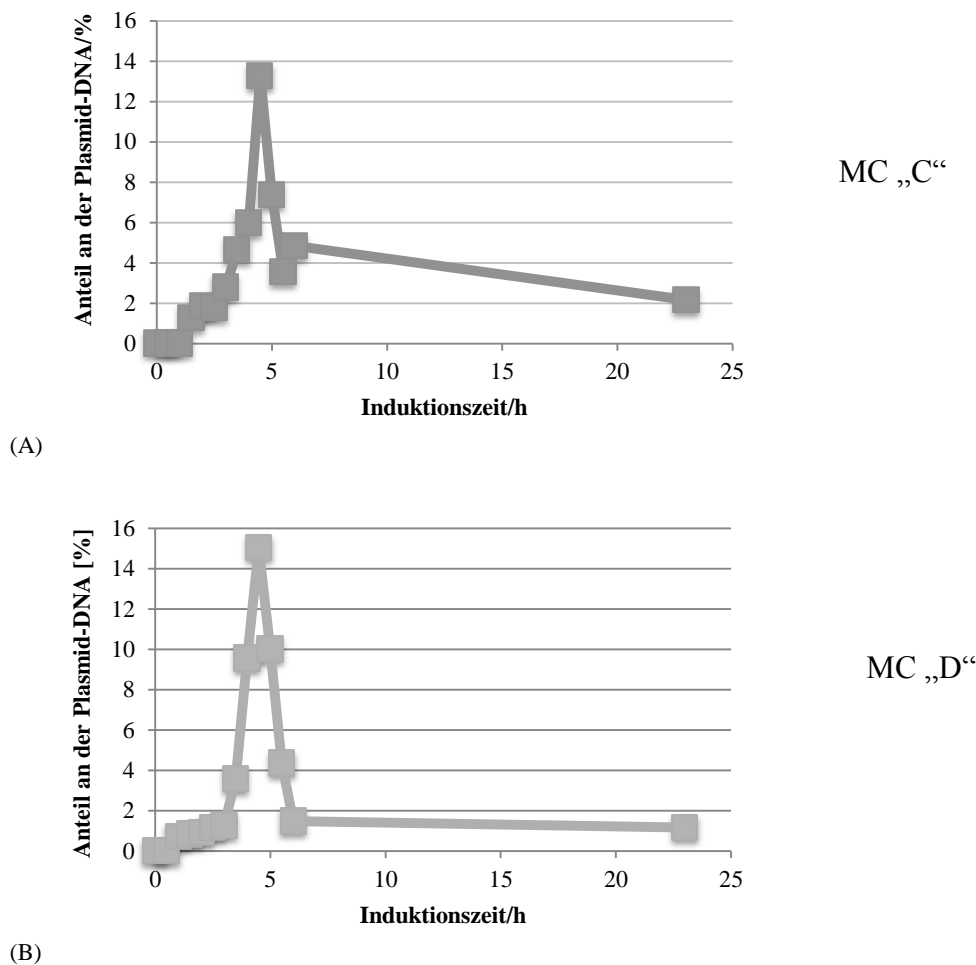
Der Vektor wurde in *E. coli* EL250 und *E. coli* TopTen FLPE transformiert. Die Induktion mit L-Arabinose wurde im 50-mL-Maßstab mit LB-Medium oder M9-Minimalmedium und L-Arabinose-Konzentrationen von 0,01 – 2 % (w/v) L-Arabinose durchgeführt. Nach der Induktion wurde jeweils die gesamte Plasmid-DNA, bestehend aus Vektor-, Miniplasmid- und Minicircle-DNA, durch Restriktionsverdau linearisiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Bandenintensitäten der unterschiedlichen DNA wurden aufgenommen und in ein Verhältnis zueinander gesetzt.

Im Vergleich zu *E. coli* TopTen FLPE führte die Induktion der Rekombination in *E. coli* EL250 zu einer 2x höheren Ausbeute an Minicircle. Die höchste Ausbeute an Minicircle wurde mit *E. coli* EL250, welche mit 0,3 % L-Arabinose für 2,5-3 h in M9-Minimalmedium induziert wurden, erhalten (Abbildung 29 (B)).

In *E. coli* TopTen FLPE findet bereits vor der L-Arabinose-Induktion Rekombination statt. Dies ist daran zu erkennen, dass vor der Induktion bereits Miniplasmid-DNA in den Zellen vorhanden war (Abbildung 29 (A) Spalte 1). Dies war in *E. coli* EL250 nicht zu beobachten. Aus diesem Grund und der Tatsache, dass *E. coli* EL250 im Vergleich zu *E. coli* TopTen FLPE eine höhere Rekombinationseffizienz aufwies, wurde für die folgenden Optimierungen der L-Arabinose-Induktion der *E. coli*-Stamm EL250 verwendet. Obwohl die L-Arabinose-Induktion in *E. coli* EL250 besser als in *E. coli* TopTen FLPE funktioniert, ist die Ausbeute an Minicircle nach 2,5 h noch relativ gering (4,7 % der gesamten Plasmid-DNA der Zelle, Abbildung 29 (C)).

Weiterhin wurde die Induktion in M9-Minimalmedium mit der in LB- und TB-Medium verglichen. In LB- und TB-Medium fand keine Rekombination statt, d.h. dass wahrscheinlich in diesen beiden Medien inhibierende Faktoren vorhanden sind bzw. die L-Arabinose nicht von den *E. coli*-Zellen aufgenommen wurde. Deshalb wurde der Verbrauch der L-Arabinose und Glucose durch Probenahme des jeweiligen Mediums vor und nach der L-Arabinose-Induktion durch quantitative Dünnschichtchromatographie überprüft. Die L-Arabinose-Konzentration nahm nur in den Ansätzen mit L-Arabinose in M9-Minimalmedium, in denen auch Rekombination stattfand, ab. In den Ansätzen mit LB- und TB-Medium (+ L-Arabinose), in denen keine Rekombination stattfand, nahm die Konzentration der Glucose stark ab, wobei die der L-Arabinose nahezu gleich blieb. Dies bedeutet, dass die Glucose die Aufnahme der L-Arabinose stört bzw. die Aufnahme der Glucose bevorzugt stattfindet. Erhöhte man die Konzentration im M9-Medium jedoch auf >1 % (w/v) L-Arabinose, wurde zwar die L-Arabinose verbraucht, jedoch war die Rekombinationseffizienz sehr gering.

Da die Induktion der Rekombination mit den festgestellten Parametern mit den Vektoren „C“ und „D“ nur zu geringen Ausbeuten führte, wurde erneut die Induktionsdauer mit diesen Vektoren optimiert. Außerdem wurde die *E. coli*-Zelldichte (über die optische Dichte (OD)) bestimmt, bei der die L-Arabinose-Induktion zur höchsten Ausbeute an Minicircle führt. Die Induktion wurde mit einer Konzentration von 0,3 % (w/v) L-Arabinose durchgeführt und erfolgte bei einer OD von 0,6, 0,9 und 1,5. Weiterhin wurde die Induktion einer Übernacht-Kultur (16 h) untersucht. Nach der Induktion wurde die Plasmid-DNA aus den *E. coli*-Zellen präpariert, durch Restriktionsverdau linearisiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt.



**Abbildung 30: Minicircle-Anteil (Minicircle „C“ und „D“) an der Plasmid-DNA im Laufe der L-Arabinose-Induktion einer *E. coli* EL250-Kultur**

Die Induktion der Rekombination in *E. coli* EL250 erfolgte für 23 h mit 0,3 %-L-Arabinose (w/v) in M9-Minimalmedium bei 30 °C. Die Induktion wurde mit einer Übernacht-(16 h)-Kultur durchgeführt. Innerhalb der ersten 6 h der Induktion wurde alle 30 min eine Probe abgenommen, zentrifugiert und das Zellpellet bei -20 °C gelagert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA aus den Zellen präpariert, in einem Restriktionsverdau in der Minicircle-Region (BstZ17I) linearisiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Bandenintensitäten der Vektor-DNA wurde mit der der Minicircle- und Miniplasmid-DNA addiert und die prozentualen Anteile der jeweiligen DNA bestimmt. (A) Anteil des Minicircles „C“ an der gesamten Plasmid-DNA der *E. coli*-Zellen (B) Anteil des Minicircles „D“ an der gesamten Plasmid-DNA der *E. coli*-Zellen.

Der höchste Anteil an Minicircle-DNA konnte für beide Vektoren mit einer Übernacht-Kultur (16 h) nach einer Inkubationszeit von 4,5 h mit 0,3 % (w/v) L-Arabinose in M9-Minimalmedium beobachtet werden. Da die beiden verwendeten Vektoren ein unterschiedliches Molekulargewicht aufweisen, kann nicht von der Größe des Konstrukts auf die Induktionsdauer geschlossen werden. Die Anteile der Minicircle-DNA an der gesamten Plasmid-DNA, bestehend aus Vektor-, Miniplasmid- und Minicircle-DNA, ist bei beiden Induktionen nahezu gleich, konnte aber im Vergleich zu der Rekombination mit dem Vektor „K“ auf bis zu 15 % gesteigert werden.

Zum Vergleich der beiden unterschiedlichen Induktionsmethoden (Hitzeinduktion, L-Arabinose-Induktion) wurde parallel eine Rekombination mit dem Vektor „K“ in *E. coli* MM294 (Hitzeinduktion) und *E. coli* EL250 (L-Arabinose-Induktion) durchgeführt. Nach der Induktion wurde die Plasmid-DNA aus den *E. coli*-Zellen präpariert, durch Restriktionsverdau linearisiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Bandenintensitäten wurden in die jeweilige DNA-Menge umgerechnet und das Verhältnis zur gesamten Plasmid-DNA errechnet (Tabelle 14).

**Tabelle 14: Entstehende Anteile der Vektor-, Miniplasmid- und Minicircle-DNA nach der Rekombination in *E. coli* MM294 und *E. coli* EL250**

	Vektor-Moleküle	MC-Moleküle	MP-Moleküle
<b>Hitzeinduktion (<i>E. coli</i> MM294)</b>	$2,64 \times 10^{10}$ (40,00 %)	$0,99 \times 10^{10}$ (15,00 %)	$2,97 \times 10^{10}$ (45,00 %)
<b>L-Arabinose-Induktion (<i>E. coli</i> EL250)</b>	$2,69 \times 10^{10}$ (40,74 %)	$1,22 \times 10^{10}$ (18,52 %)	$2,69 \times 10^{10}$ (40,74 %)

Die Hitzeinduktion erfolgte gemäß etabliertem Protokoll (s. Material und Methoden). Die L-Arabinose-Induktion erfolgte für 4,5 h bei 30 °C mit 0,3 % (w/v) L-Arabinose in M9-Minimalmedium. Anschließend wurde die Plasmid-DNA aus den Zellen präpariert, in einem Restriktionsverdau in der Miniplasmid-Region (SpeI) oder in der Minicircle-Region (BstZ17I) linearisiert und 400 ng Plasmid-DNA gelelektrophoretisch parallel zu einem quantitativen Größenmarker aufgetrennt. Die Menge an DNA pro Bande wurde durch Vergleich der jeweiligen Bandenintensitäten mit dem quantitativen Größenmarker bestimmt und das jeweilige Verhältnis zur gesamten Plasmid-DNA ermittelt. In Klammern ist jeweils der prozentuale Anteil der jeweiligen DNA an der gesamten Plasmid-DNA dargestellt.

Durch das verbesserte Protokoll zur L-Arabinose-Induktion konnte die Rekombinationseffizienz auch mit dem Vektor „K“ gesteigert werden. Die Minicircle-Ausbeute wurde von 4,7 % (Abbildung 29 (C)) auf 18,52 % gesteigert.

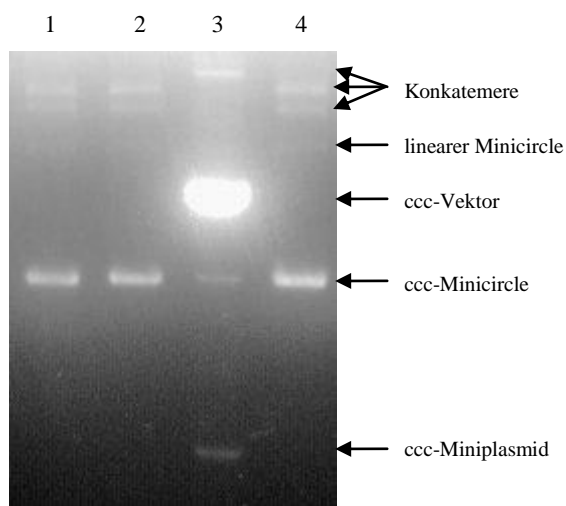


### 3.2.2. Generierung *in vitro*

Minicircles durch Rekombination in *E. coli*-Zellen herzustellen, garantiert superhelikale Minicircle-DNA-Formen. Es wurde gezeigt, dass dieser Status für den Transfer der DNA in eukaryotische Zellen vorteilhaft ist. Die *in vivo*-Generierung in *E. coli* mit anschließender Aufreinigung über eine Agarose-Gelelektrophorese ist jedoch ineffizient, sodass die Ausbeute an Minicircle, bezogen auf die eingesetzte Menge an Bakterienkultur, relativ gering ist. Eine permanente Expression der FLP-Rekombinase würde zu einer frühen Eliminierung des Ausgangsvektors führen. Deshalb muss die Expression der FLP-Rekombinase induziert werden. Dies wird häufig in einem Batch-Ansatz durchgeführt, der meist weitgehend unkontrolliert verläuft, d.h. wichtige Parameter, wie z.B. der pH-Wert, die Menge an gelöstem Sauerstoff und die Glucose- oder L-Arabinosekonzentration im Medium werden nicht kontrolliert. Aus diesem Grund kann keine optimale Ausbeute an Minicircle generiert werden. Da die Beibehaltung der superhelikalen Struktur für den Einsatz der Minicircles in eukaryotischen Zellen von großer Bedeutung ist, sind auch die Anforderungen an die Aufreinigungsmethode zur Isolierung der Minicircle entsprechend hoch, um die gewünschte Struktur der Minicircle während der Aufreinigung nicht zu zerstören. In dem bisher durchgeführten Verfahren zur Generierung der Minicircle erfolgte die Abtrennung der Minicircle von der restlichen Plasmid-DNA (Ursprungsvektor, Miniplasmid, evtl. entstehende Konkatemere) durch eine Linearisierung der unerwünschten Moleküle mithilfe von Restriktionsenzymen, die keine Erkennungsstelle im Minicircle besitzen und daher den superhelikalen (ccc-)Zustand der Minicircles nicht verändern, gefolgt von einer gelelektrophoretischen Auftrennung des DNA-Gemisches. Anschließend wird die Minicircle-DNA aus dem Gel aufgereinigt. Es konnte jedoch regelmäßig beobachtet werden, dass die Reinheit der Minicircle bei diesem Verfahren zum Teil nicht ausreichend war, d.h. die aufgereinigte DNA enthielt neben der Minicircle- zusätzlich noch weitere Plasmid-DNA (Ursprungsvektor, Miniplasmid, evtl. entstehende Konkatemere).

Um das Verfahren zu vereinfachen, wurde ein *in vitro*-System untersucht, das auf den Einsatz von Rekombinasen zur Generierung von Minicircles und auf überflüssige bakterielle Sequenzen im Minicircle komplett verzichtet. Die *in vitro*-Herstellung beruht auf der Zirkularisierung eines linearen Minicircle-Fragments durch Ligation, gefolgt von einer DNA-Gyrase-Behandlung. Das lineare Fragment wurde dabei durch Restriktion aus dem Ursprungsvektor erhalten. Mit diesem Verfahren konnte die Ausbeute und Reinheit der Minicircles erhöht werden. Zur Entwicklung dieses Verfahrens wurde zunächst der Vektor

pEPI-delCM18 (Vektorkarte: s. Abbildung 12) in den *E. coli*-Stamm XL1 Blue transformiert, da in diesem Stamm eine hohe Kopienzahl an transformiertem Vektor generiert werden kann. Anschließend wurde die Vektor-DNA aus den Bakterien isoliert und durch ein Restriktionsenzym (XbaI), welches nur in den beiden Rekombinaseerkennungstellen („FRT-sites“) schneidet, in linearen Minicircle und lineares Miniplasmid getrennt. Diese wurden anschließend gelelektrophoretisch voneinander getrennt und die Minicircle-DNA aufgereinigt. Anschließend erfolgte die Zirkularisierung des Minicircles durch eine T4-Ligase mit anschließender Einführung der superhelikalen Form durch eine bakterielle DNA-Gyrase. Der Minicircle wird somit überwiegend *in vitro* hergestellt und wird deshalb im Folgenden als „*in vitro*“-Minicircle bezeichnet. Die Behandlung der zirkulären Minicircle-DNA mit der DNA-Gyrase erfolgte dabei für 30 min, 2 h und 5 h. Zum Vergleich wurde der Minicircle durch die L-Arabinose-Induktion in *E. coli* EL250 hergestellt.

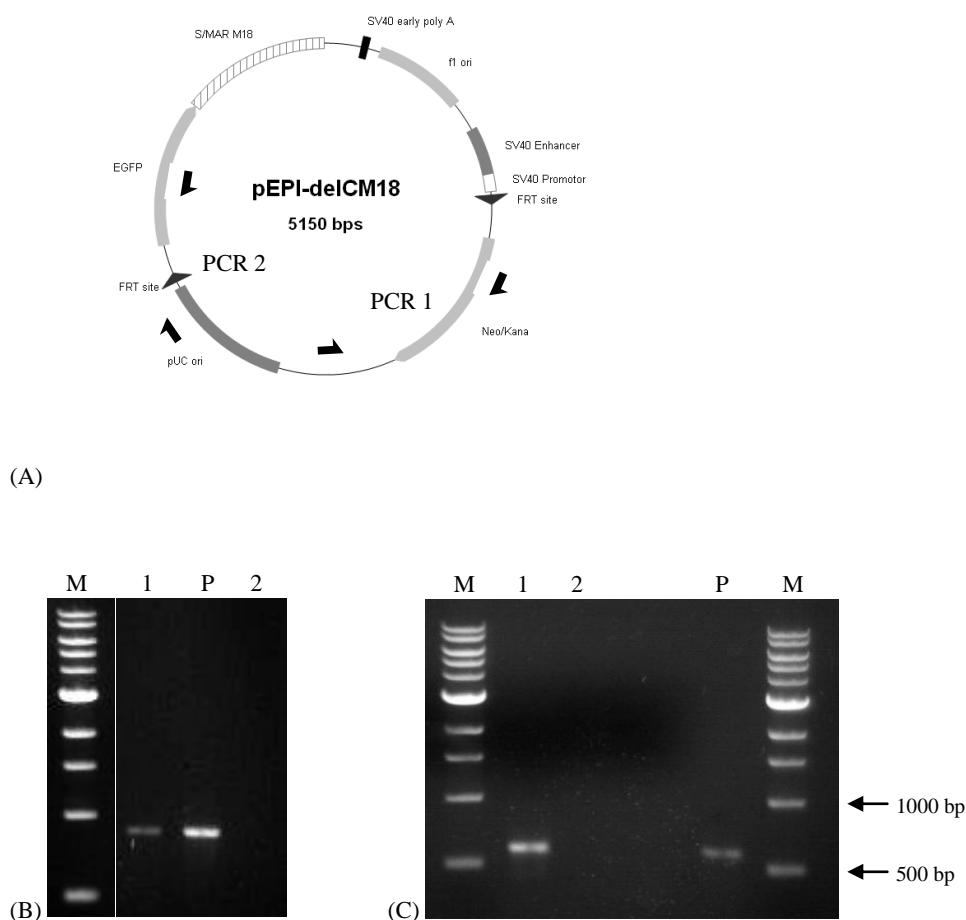


**Abbildung 31:** Vergleich des „*in vitro*“-Minicircles mit *in vivo* rekombiniertem Minicircle mithilfe eines Agarosegels (1%)

Der „*in vitro*“-Minicircle wurde durch Restriktion mit dem Enzym XbaI, gelelektrophoretischer Auftrennung, Aufreinigung und anschließender Rezirkularisierung mit einer T4-Ligase aus dem Ursprungsvektor pEPI-delCM18 generiert. Anschließend wurde die zirkularisierte DNA (je 1 µg) für 30 min (Spur 1), 2 h (Spur 2) oder 5 h (Spur 4) mit 1 U DNA-Gyrase behandelt. Die Spur 3 zeigt das pEPI-delCM18-Plasmid-Gemisch nach der ortsspezifischen Rekombination in *E. coli* EL250 (Induktion mit 0,3 % (w/v) L-Arabinose). Spur 1 = „*in vitro*“-Minicircle nach 30 min DNA-Gyrase-Behandlung, Spur 2 = „*in vitro*“-Minicircle nach 2 h DNA-Gyrase-Behandlung, Spur 3 = Plasmid-DNA nach der Rekombination in *E. coli* EL 250, Spur 4 = „*in vitro*“-Minicircle nach 5 h DNA-Gyrase-Behandlung, ccc = superhelikale DNA-Form („*covalently closed circular*“-DNA).

Bereits nach einer Inkubationszeit von 30 min mit DNA-Gyrase besitzt der „*in vitro*“-Minicircle einen superhelikalen Zustand. Im Vergleich zur Generierung der Minicircles in *E. coli* EL250 ist deutlich zu erkennen, dass der Ausgangsvektor vollständig prozessiert wurde

und der Ansatz keine Miniplasmid-DNA mehr enthält. Nach der Rezirkularisierung und dem Einführen der superhelikalen Form verbleiben in der Probe nur noch ccc-Minicycle-Konkatemere, ccc-Minicycle-Monomere und lineare Minicycle-DNA, die nicht rezirkularisiert wurde. Die unerwünschte DNA kann durch Aufreinigen der ccc-Minicycle-DNA aus dem Agarosegel entfernt werden. Die Ausbeute an Minicycle-DNA, bezogen auf das Volumen der eingesetzten Bakterienkultur, ist bei dem „*in vitro*“-Minicycle 10-15x höher als bei der Generierung durch ortsspezifische Rekombination in EL250.



**Abbildung 32: Überprüfung der Reinheit der generierten Minicircles durch PCR**

Um die aufgereinigte Minicycle-DNA aus pEPI-delCM18 auf mögliche Verunreinigungen mit dem Miniplasmid und dem Ursprungsvektor zu überprüfen, wurden die PCR 1 und die PCR 2 durchgeführt. Für die PCR wurden jeweils 10 ng DNA verwendet. Als Positivkontrolle wurde jeweils die PCR mit dem Ursprungsvektor durchgeführt. (A) Vektorkarte des Vektors pEPI-delCM18 mit den Primerbindungsstellen der beiden PCRs. (B) Entstehende Amplifikate der PCR 1 (Primer pEpi-CM18HC S/MAR und HLCM18FRTrev). In dem Ansatz mit dem durch ortsspezifische Rekombination generierten Minicycle ist ein Amplifikat entstanden, d.h. dass die DNA-Probe entweder Miniplasmid und/oder Ursprungsvektor enthält. (C) Entstehende Amplifikate der PCR 2 (Primer pUCori\_fw und pUCori\_rev). Es ist ebenfalls in dem Ansatz mit dem durch ortsspezifische Rekombination generierten Minicycle ein Amplifikat entstanden, d.h. dass die DNA-Probe den Ursprungsvektor enthält, da dieses Amplifikat teilweise aus Miniplasmid- und Minicycle-DNA besteht. M = 1 kbp DNA-

Leiter (lineare DNA), 1 = Aufgereinigte Minicircle-Probe aus der ortsspezifischen Rekombination in *E. coli* EL250, 2 = Aufgereinigte Minicircle-Probe aus der *in vitro*-Generierung („*in vitro*“-Minicircle), P = Positivkontrolle (Vektor pEPI-delCM18).

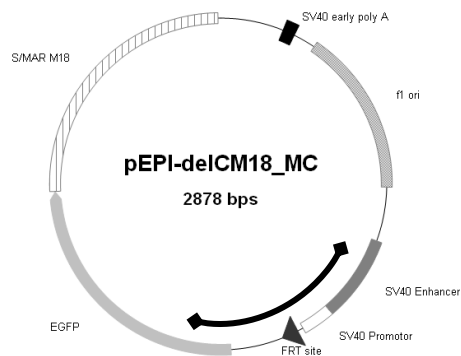
Um die Reinheit des „*in vitro*“-Minicircles im Vergleich zum Minicircle, der durch ortsspezifische Rekombination generiert wurde, zu überprüfen, wurde nach der Aufreinigung des jeweiligen Minicircles eine PCR auf die Miniplasmid-Region (beide Primer liegen in der Miniplasmid-Region, PCR 1) und auf den Ursprungsvektor (ein Primer liegt in der Minicircle- und einer in der Miniplasmid-Region, PCR 2) durchgeführt (Abbildung 32). Dazu wurden Minicircles verwendet, die aus dem Vektor pEPI-delCM18 generiert wurden.

Die Probe mit der Minicircle-DNA, die durch ortsspezifische Rekombination generiert wurde, enthält nach der Aufreinigung weiterhin den Ursprungsvektor und eventuell auch das Miniplasmid. Die „*in vitro*“-Minicircle-DNA enthält dagegen keine Verunreinigungen durch den Ursprungsvektor und das Miniplasmid.

Durch eine partielle Sequenzierung des „*in vitro*“-Minicircle wurde untersucht, ob dieser auch im Hinblick auf seine Sequenz dem durch ortsspezifische Rekombination generierten Minicircle entspricht. Dazu wurde die Region der FRT-Rekombinationsstelle, über die die ortsspezifische Rekombination und beim „*in vitro*“-Minicircle die Restriktion (XbaI) und Ligation stattfindet, sequenziert (Abbildung 33). Die Sequenz des „*in vitro*“-Minicircles entspricht der des durch ortsspezifische Rekombination entstehenden Minicircle bzw. des *in silico* vorhergesagten Minicircles.

Weiterhin wurde die superhelikale Form (ccc-Form) des „*in vitro*“-Minicircles mit der des durch ortsspezifische Rekombination generierten Minicircles verglichen. Der superhelikale Zustand einer DNA, d.h. die Stärke der DNA-Verdrillung, ist entscheidend für die Effizienz von DNA-Vektoren bezüglich deren Eigenschaft zum Transfer in eukaryotische Zellen. Außerdem hat die Verdrillung signifikante Auswirkungen auf die Stabilität der Expression und die Integration in das Wirtsgenom.<sup>[282]</sup> Um den Grad der Verdrillung von superhelikaler DNA zu untersuchen, wurde dem Agarosegel Chloroquin in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt. Chloroquin kann sich in der DNA-Doppelhelix zwischen benachbarte Basenpaare schieben, es interkaliert also in die DNA, wodurch es zur Entwindung der DNA kommt. Der Grad der negativen Superhelizität der DNA sinkt dadurch. Die Interkalation in die DNA bewirkt also eine Senkung der Anzahl an negativen Helixdrehungen. Es kommt somit zur Relaxation der negativen Verdrillungen der DNA. Die

ccc-DNA trennt sich somit je nach Stärke der negativen Verdrillung im Chloroquin-Agarosegel auf.



(A)

pEpi_delCM18-MC Sequenzierung	TCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGA TCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGA *****
pEpi_delCM18-MC Sequenzierung	AAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCA AAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCA *****
pEpi_delCM18-MC Sequenzierung	ACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCGCCCCAT ACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCGCCCCAT *****
pEpi_delCM18-MC Sequenzierung	TCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGTCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCC TCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGTCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCC *****
pEpi_delCM18-MC Sequenzierung	TCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGGACGGTATCGAGCTTGAAG TCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGGACGGTATCGAGCTTGAAG *****
pEpi_delCM18-MC Sequenzierung	TTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACCTCGGAATAGGAACCTCACCGGTCGCCACCATG TTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACCTCGGAATAGGAACCTCACCGGTCGCCACCATG *****
pEpi_delCM18-MC Sequenzierung	GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGC GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGC *****
pEpi_delCM18-MC Sequenzierung	GACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCG GACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCG *****

(B)

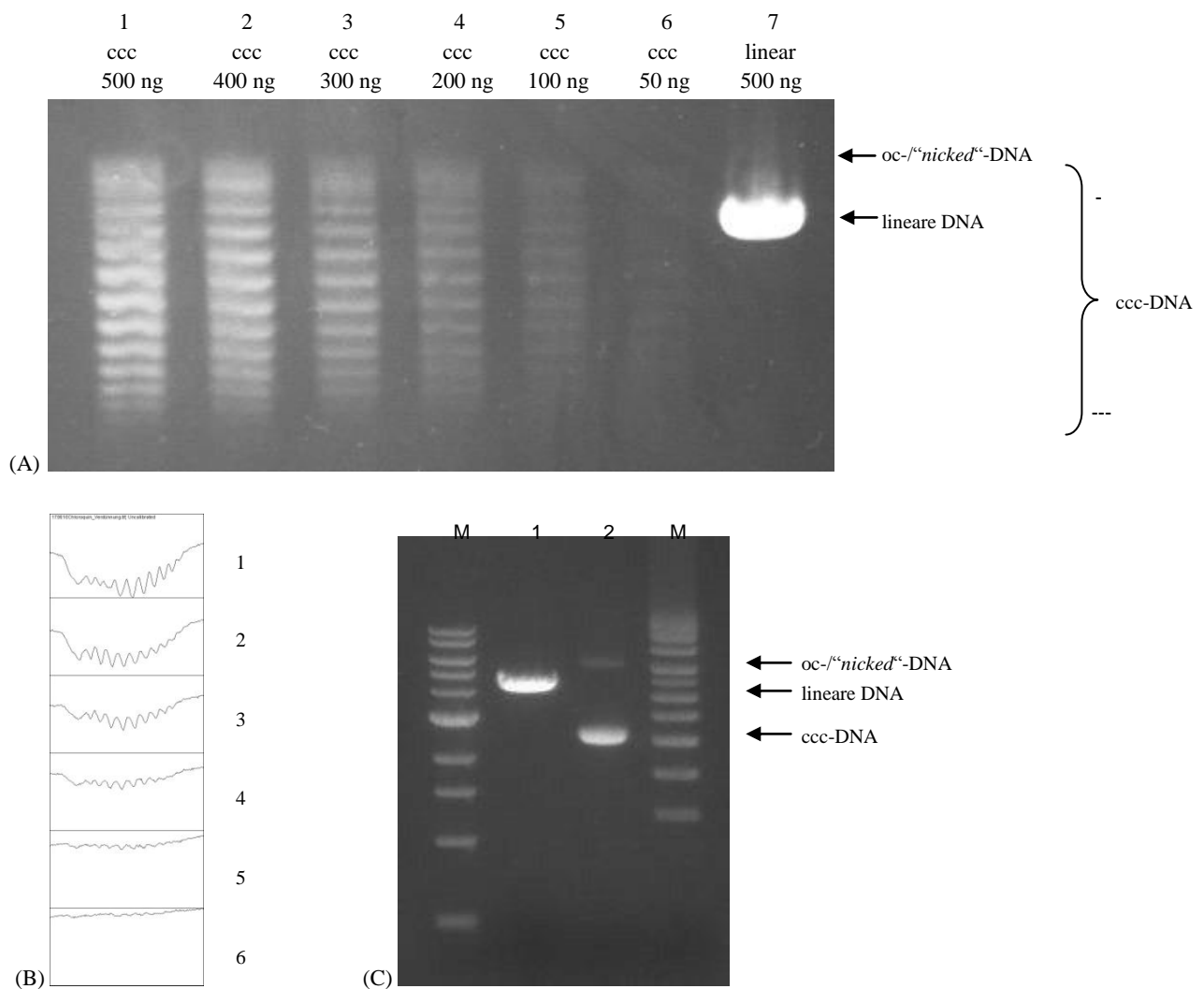
**Abbildung 33: Sequenzierung des „in vitro“-Minicircles aus pEpi-delCM18opt**

(A) Vektorkarte von pEPI-delCM18, die sequenzierte Region ist markiert. (B) Vergleich der Sequenz des „in-vitro“-Minicircles mit der Vektorkarte durch das Programm ClustalW (EMBL-EBI). rot = FRT-site, blau= XbaI-Schnittstelle innerhalb der FRT-site, \* = Basen-Übereinstimmung.

Positiv verdrillte DNA bleibt durch Chloroquin unbeeinflusst. Es kommt weder zu einer Steigerung noch zu einer Senkung der positiven Helixdrehungen. Die positiv verdrillte DNA

läuft im Chloroquin-Agarosegel schneller als alle anderen DNA-Topoisomere und wird in diesem Gel nicht in unterschiedliche Verdrillungsgrade aufgetrennt.<sup>[213,281]</sup>

Da die Ausbeute an durch ortsspezifische Rekombination generiertem Minicircle sehr gering ist, wurde vor dem Vergleich der beiden Verfahren zuerst die DNA-Nachweisgrenze für ein Chloroquin-Agarosegel bestimmt. Dazu wurden unterschiedliche Menge des Vektors pEPI-delCM18 im Chloroquin-Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt (Abbildung 34).



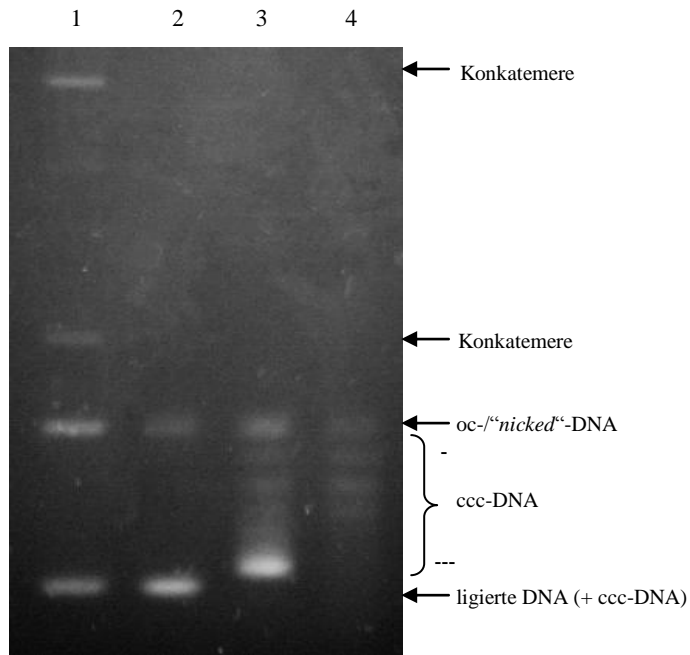
**Abbildung 34: Auftrennung des Vektors pEPI-delCM18 auf einem Chloroquin-Agarosegel (A) und einem Standard-Agarosegel (C)**

(A) Die DNA wurde aus *E. coli* XL1 Blue aufgereinigt und für 15 h bei  $2,5 \text{ V cm}^{-1}$  auf einem Chloroquin-Agarosegel (0,8 % (w/v) Agarose) aufgetrennt. Das Gel enthielt  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  Chloroquin-Diphosphat. Die Spalte 1-6 enthält unterschiedliche Mengen an *ccc*-DNA, die Spalte 7 enthält den mit dem Restriktionsenzym FspI linearisierten Vektor. (B) Die entstehenden Bandenmuster wurden mit dem Programm ImageJ densitometrisch quantifiziert. 100-200 ng sind ausreichend, um ein deutliches Bandenmuster detektieren zu können. (C) Die DNA wurde für 30 min bei  $8 \text{ V cm}^{-1}$  auf einem Standard-

Agarosegel (1% (w/v) Agarose) aufgetrennt. Im Standard-Agarosegel besitzt die ccc-DNA nur eine Bande, die sich im Chloroquin-Agarosegel gemäß der Stärke der Verdrillungen auftrennt. M = 1 kbp DNA-Leiter (lineare DNA), 1 = mit dem Restriktionsenzym FspI linearisierter Vektor, 2 = unbehandelter Vektor mit einer oc- und einer ccc-Bande, oc-DNA = Ringförmige DNA ohne superhelikale Verdrillungen („*open circle*“-DNA), „*nicked*“-DNA = Zirkuläre DNA mit einem Einzelstrangbruch, ccc-DNA = Superhelikale DNA-Form („*covalently closed circular*“-DNA), - = Schwach-negativ verdrillte ccc-DNA, --- = Stark-negativ verdrillte ccc-DNA.

In Abbildung 34 (A) und (B) ist zu erkennen, dass sich die ccc-DNA des Vektors pEPI-delCM18 aus *E. coli* XL1 Blue gemäß der verschiedenen negativen Verdrillungsstadien im Chloroquin-Agarosegel auftrennen lässt. Die Intensität der Banden hängt von der Häufigkeit des jeweiligen Verdrillungsstatus ab. Für die Auftrennung der ccc-DNA reichen 100-200 ng DNA aus, um das entstehende Bandenmuster mit ImageJ quantitativ auswerten zu können. Die stark-negativ verdrillten ccc-DNA-Moleküle laufen im Chloroquin-Agarosegel schneller als die schwach-negativ verdrillten ccc-DNA-Moleküle. Die oc- bzw. „*nicked*“-DNA läuft, wie auch im Standard-Agarosegel, am langsamsten und die lineare DNA liegt innerhalb der Verteilung der ccc-DNA.

Zum Vergleich der „*in vitro*“- und der „*E. coli in vivo*“-Minicircles wurden diese auf einem Chloroquin-Agarosegel aufgetrennt. Zusätzlich wurde die Minicircle-DNA nach der Restriktion/Ligation-Reaktion aufgetragen (Abbildung 35). Nach der Ligation der „*in vitro*“-Minicircles liegen Konkatemere und Monomere des „*in vitro*“-Minicircles vor. Die Monomere liegen als oc- bzw. „*nicked*“-DNA und positiv verdrillte ccc-DNA vor. Zur Generierung der ccc-„*in vitro*“-Minicircles wurde untersucht, ob die T4-Ligase zusammen mit der Gyrase in einem Reaktionsansatz eingesetzt werden kann. Dies ist jedoch unter den gewählten Reaktionsbedingungen nicht möglich. Die Behandlung der ligierten DNA zeigte in diesem Fall keine Wirkung. Die Aufreinigung der Ligation mit anschließender Gyrasebehandlung zeigte dagegen ein positives Ergebnis, es wurden negative Verdrillungen in die ligierte DNA durch die DNA-Gyrase eingefügt. Beim Vergleich der beiden Minicircles ist erkennbar, dass ein vergleichbares Bandenmuster entstanden ist. Bei dem „*in vitro*“-Minicircle ist eine Bande besonders ausgeprägt, die stark-negativ verdrillte DNA darstellt. Es ist also möglich, Minicircles *in vitro* zu generieren, die, im Hinblick auf die Superhelizität, den Minicircles entsprechen, der durch ortsspezifische Rekombination generiert wurde.

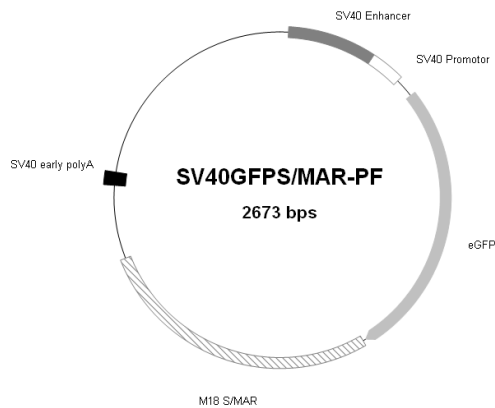


**Abbildung 35: Vergleich der Verdrillung des „*in vitro*“-Minicircles mit dem durch ortsspezifische Rekombination generierten Minicircle aus dem Vektor pEPI-delCM18**

Es wurden jeweils 100 ng DNA für 15 h bei  $2,5 \text{ V cm}^{-1}$  auf einem Chloroquin-Agarosegel (0,8 % (w/v) Agarose) aufgetrennt. Das Gel enthielt  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  Chloroquin-Diphosphat. Spur 1 = Der „*in vitro*“ Minicircle wurde durch Restriktionsverdau des Ursprungsvektors mit den Enzymen XbaI und BstBI und anschließender Rezirkulierung mit einer T4-Ligase hergestellt. Dabei entstand neben der oc-DNA auch eine spezielle DNA-Form, die hier als ligierte DNA bezeichnet wird. Diese DNA-Form läuft schneller als die negativ verdrillte DNA im verwendeten Chloroquin-Agarosegel. Die ligierte DNA besitzt wahrscheinlich positive Superhelices. Spur 2 = Die Gyrase und der Gyrasepuffer wurden direkt dem Ligationsansatz (1  $\mu\text{g}$  DNA) hinzugefügt. Es hat keine negative Verdrillung der ligierten DNA stattgefunden. Spur 3 = Der T4-Ligationsansatz wurde zunächst aufgereinigt. Anschließend wurde 1  $\mu\text{g}$  ligierte DNA für 2 h mit 5 U DNA-Gyrase behandelt. Die ligierte DNA wurde negativ verdrillt. Spur 4 = Der Minicircle wurde durch ortsspezifische Rekombination hergestellt. oc-DNA = Ringförmige DNA ohne superhelikale Verdrillungen („*open circle*“-DNA), „*nicked*“-DNA = Zirkuläre DNA mit einem Einzelstrangbruch, ccc = Superhelikale DNA-Form („*covalently closed circular*“-DNA), - = Schwach-negativ verdrillte ccc-DNA, --- = Stark-negativ verdrillte ccc-DNA, + ccc-DNA = Resultierende DNA-Form aus der Ligation mit einer T4-Ligase. Während der Ligation wurden positive Superhelices durch die T4-Ligase eingefügt.

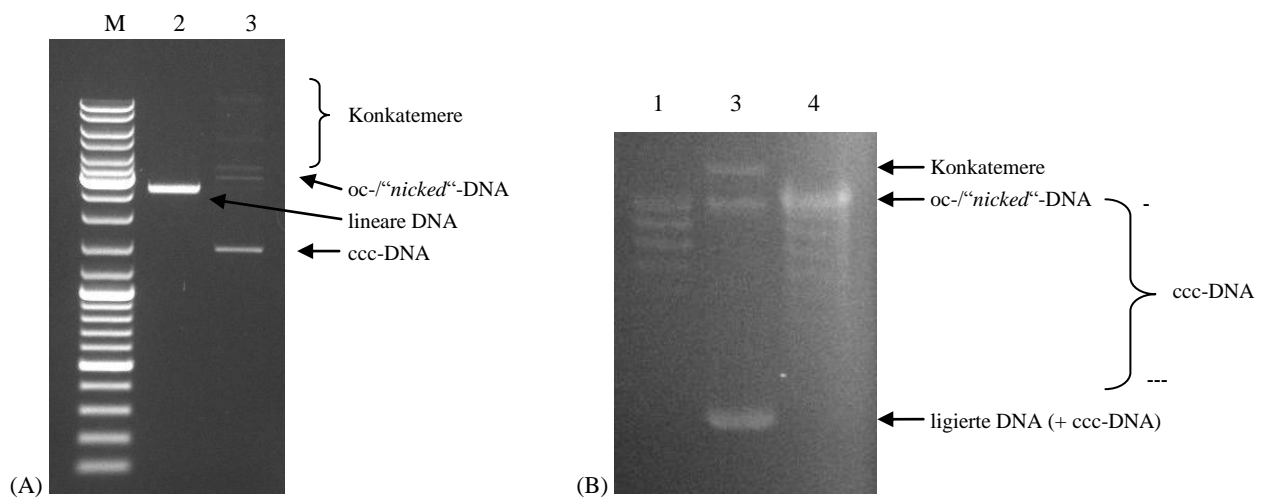
Zur Untersuchung der entstehenden DNA-Topologie der zirkulären DNA nach der Restriktion/Ligation-Reaktion wurde der Minicircle SV40GFPS/MAR (PlasmidFactory) verwendet (Abbildung 36). Der Minicircle wurde zunächst durch Restriktion linearisiert und anschließend durch die Behandlung mit T4-Ligase rezirkularisiert und durch eine DNA-Gyrase in den ccc-Zustand überführt. Die entstehenden DNA-Topoisomere wurden auf einem Standard- und einem Chloroquin-Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 37).





**Abbildung 36: Vektorkarte des Minicircles SV40GFPS/MAR**

Der Minicircle besteht aus dem EGFP-Gen unter der Kontrolle eines SV40-Promotors, dem S/MAR M18 und einem SV40-Polyadenylierungssignal. Das codierte EGFP besitzt eine Halbwertszeit von ~ 26 h.



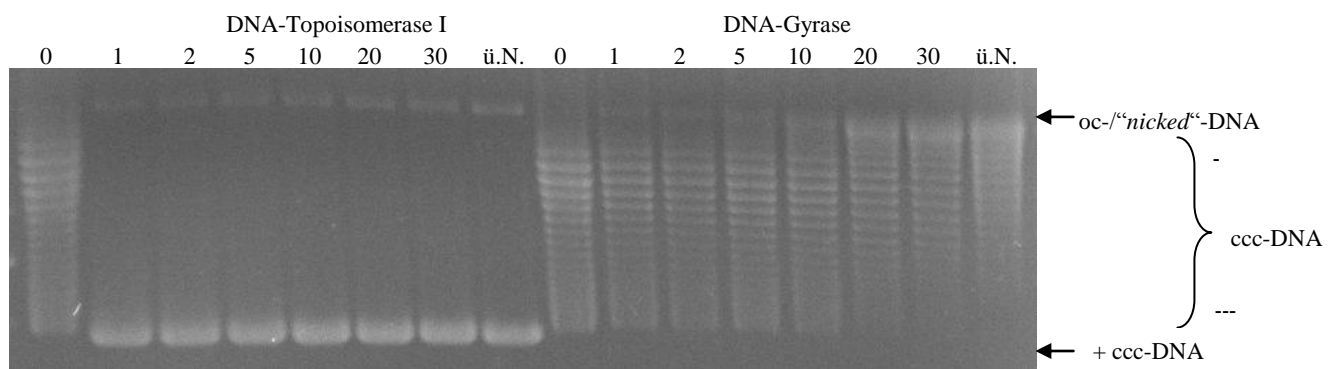
**Abbildung 37: Untersuchung des zirkulären Minicircles SV40GFPS/MAR (PlasmidFactory) nach der Behandlung mit einer T4-Ligase und DNA-Gyrase**

Der Minicircle wurde mit dem Restriktionsenzym SpeI linearisiert und anschließend mit einer T4-Ligase religiert. Es wurden jeweils 100 ng DNA aufgetragen. Spur 1 = Unbehandelte Minicircle-DNA, Spur 2 = Linearisierte Minicircle-DNA, Spur 3 = Minicircle-DNA, die zunächst linearisiert und anschließend religiert wurde, Spur 4 = Minicircle-DNA, die im Anschluß an die Linearisierung und die Religation mit 1 U DNA-Gyrase für 10 min behandelt wurde. (A) Auftrennung der linearen und religierten DNA auf einem Standard-Agarosegel (1% (w/v) Agarose) für 30 min bei 5 V cm<sup>-1</sup>. Bei der Ligation entsteht, neben oc-DNA und Konkatemenen, überwiegend ccc-DNA. (B) Auftrennung der unbehandelten, religierten und mit DNA-Gyrase behandelten Minicircle-DNA auf einem Chloroquin-Agarosegel (0,8% (w/v) Agarose) für 15 h bei 2,5 V cm<sup>-1</sup>. Bei der religierten DNA ist neben den Konkatemenen und der oc-DNA ausschließlich die positiv verdrehte Minicircle-Form zu erkennen. Nach der kurzen Gyrasebehandlung ist ein Bandenmuster aus schwach-negativ verdrehter ccc-DNA und oc-/„nicked“-DNA zu erkennen. oc-DNA = Ringförmige DNA ohne superhelikale Verdrehungen („open circle“-DNA), „nicked“-DNA = Zirkuläre DNA mit einem Einzelstrangbruch, ccc-DNA = Superhelikale DNA-Form („covalently closed

*circular*<sup>+</sup>-DNA), - = Schwach-negativ verdrillt ccc-DNA, --- = Stark-negativ verdrillte ccc-DNA, + ccc-DNA = Positiv verdrillte DNA-Form aus der Ligation mit einer T4-Ligase. M = 1 kbp DNA-Leiter (lineare DNA).

Wie bereits in Abbildung 35 gezeigt, entsteht nach der Ligation mit einer T4-Ligase positiv verdrillte DNA (Abbildung 37). Bereits nach einer kurzen Inkubationszeit der ligierten DNA-Probe mit DNA-Gyrase entsteht ein Bandenmuster, das auf schwach-negativ verdrillte DNA schließen lässt.

Um die Möglichkeit des gezielten Einfügens von negativen Verdrillungen zu untersuchen, wurde der ccc-Minicircle SV40GFPS/MAR für unterschiedliche Inkubationszeiten mit DNA-Gyrase und DNA-Topoisomerase I behandelt. Die DNA-Gyrase fügt negative Verdrillungen ein, Topoisomerase I dagegen entfernt negative Verdrillungen. Anschließend wurde die Verteilung der ccc-DNA auf einem Chloroquin-Agarosegel untersucht (Abbildung 38).



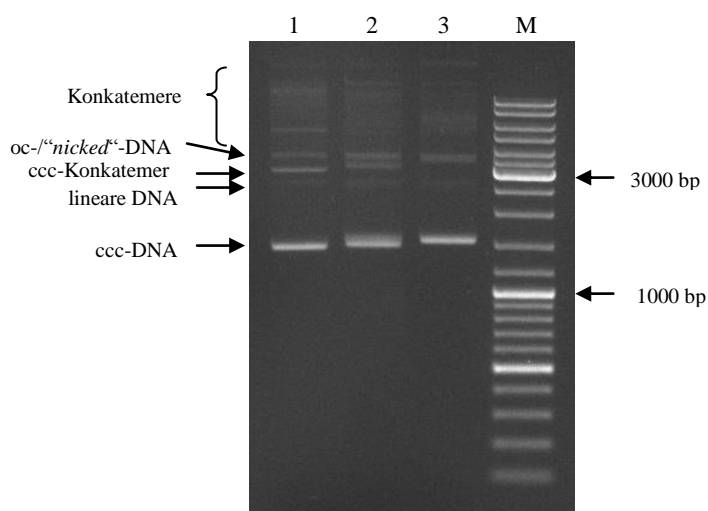
**Abbildung 38: Topoisomer-Verteilung des Minicircles SV40GFPS/MAR nach der Inkubation mit DNA-Gyrase und DNA-Topoisomerase I**

Je 1 µg des Minicircles (negativ verdrillte ccc-DNA) wurde für eine Zeit zwischen 1 min und 16 h (über Nacht) mit 1 U DNA-Gyrase oder DNA-Topoisomerase I behandelt. Die Reaktion wurde jeweils mit 10 mmol L<sup>-1</sup> EDTA (10 min) inaktiviert. Anschließend wurden die Ansätze auf einem Chloroquin-Agarosegel (0,8 % (w/v) Agarose) bei 5 V cm<sup>-1</sup> für 2 h aufgetrennt. Das Gel enthielt 15 µg mL<sup>-1</sup> Chloroquin-Diphosphat. Durch die Inkubation der DNA mit DNA-Topoisomerase I sind bereits nach 1 min nur noch 2 Banden zu erkennen. Im Laufe der Inkubationszeit mit DNA-Gyrase verschiebt sich die Topoisomer-Verteilung zu den schwach-negativ verdrillten Topoisomeren bzw. zur *oc-/nicked*-DNA, die stark-negativ verdrillten Topoisomere sind nach 30 min nahezu verschwunden. 0-30 = Inkubationszeit in Minuten, oc-DNA = ringförmige DNA ohne superhelikale Verdrillungen („*open circle*“-DNA), „*nicked*“-DNA = Zirkuläre DNA mit einem Einzelstrangbruch, ccc-DNA = superhelikale DNA-Form („*covalently closed circular*“-DNA), - = Schwach-negativ verdrillte ccc-DNA, --- = Stark-negativ verdrillte ccc-DNA, + ccc-DNA = Positiv verdrillte DNA-Form aus der Topoisomerase I-Behandlung.

Aufgrund des Laufverhaltens der mit Topoisomerase I behandelten negativ verdrillten DNA im Chloroquin-Agarosegel wird deutlich, dass wahrscheinlich neben *oc-/nicked*-DNA überwiegend DNA mit einer gewissen positiven Verdrillung entstanden ist. Bereits durch eine Inkubation von 1 µg DNA mit 1 U DNA-Topoisomerase I für 1 min konnte eine vollständige Entfernung der negativen Superhelices der DNA bewirkt werden.

Gegen die Erwartung wurden durch die DNA-Gyrase negative Superhelices entfernt, sodass nach 30 min keine stark-negativ verdrillte DNA mehr zu erkennen ist.

Der superhelikale Status der Minicircles ist für die weitere Verwendung zur Transfektion von eukaryotischen Zellen notwendig. Das gezielte Einfügen von Verdrillungen bzw. die Generierung von Minicircles mit einer bestimmten Topoisomer-Verteilung bietet die Möglichkeit Transfektionen mit Minicircles mit einer bestimmten Topoisomer-Verteilung durchzuführen. Im Folgenden wurden unterschiedliche Topoisomer-Verteilungen des Minicircles SV40GFPS/MAR generiert.



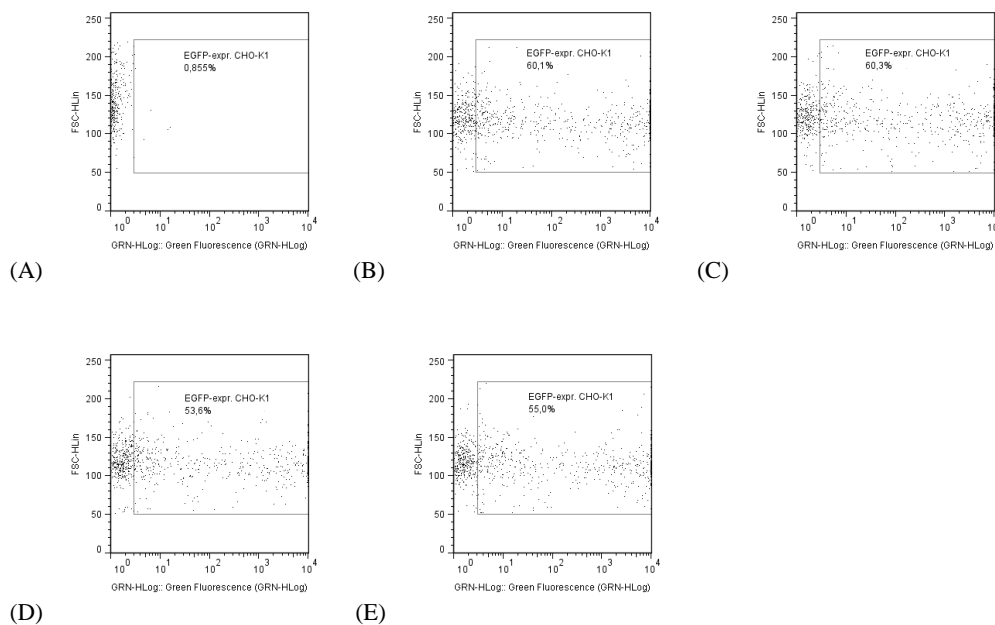
**Abbildung 39: Unterschiedliche Topoisomer-Verteilungen des Minicircles SV40GFPS/MAR**

Der Minicircle wurde durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym *SpeI* linearisiert und anschließend mit einer T4-Ligase zirkularisiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der DNA mit DNA-Gyrase (1 U) für 30 min oder 16 h (über Nacht). Danach wurde jeweils eine Probe vom Ansatz auf einem Standard-Agarosegel (1% (w/v) Agarose, 0,5 mg mL<sup>-1</sup> Ethidiumbromid) für 30 min bei 5 V cm<sup>-1</sup> elektrophoretisch aufgetrennt. Spur 1 = Minicircle-Probe nach der Zirkularisierung. Neben Konkatermenen und oc-/‘nicked’-DNA, ist überwiegend ccc-DNA vorhanden, Spur 2 = Minicircle-Probe nach der Zirkularisierung und DNA-Gyrase-Behandlung für 30 min, Spur 3 = Minicircle-Probe nach der Zirkularisierung und DNA-Gyrase-Behandlung für 16 h. Da das Ethidiumbromid in dem verwendeten Standard-Agarosegel in die ccc-DNA interkaliert, führt dies zu einer Änderung des Laufverhaltens der ccc-DNA. Die Beeinflussung des Laufverhaltens ist jedoch viel geringer als bei der Nutzung von Chloroquin. Trotzdem ist ein Unterschied zwischen dem Laufverhalten der ligierten positiv verdrillten ccc-DNA und der durch die DNA-Gyrase negativ verdrillten ccc-DNA zu erkennen, mit der Zahl der eingefügten negativen Verdrillungen läuft die DNA langsamer. oc = Ringförmige DNA ohne superhelikale Verdrillungen („open circle“-DNA), „nicked“-DNA = Zirkuläre DNA mit einem Einzelstrangbruch, ccc = Superhelikale DNA-Form („covalently closed circular“-DNA), M = 1 kbp DNA-Leiter (lineare DNA).

Es ist deutlich ein Unterschied zwischen dem Laufverhalten der ligierten positiv verdrillten ccc-DNA und der durch die DNA-Gyrase negativ verdrillten ccc-DNA zu erkennen. Dies ist sowohl bei den DNA-Monomeren als auch bei den DNA-Konkatemeren der Fall. Mit der

Zahl der eingefügten negativen Verdrillungen läuft die negativ verdrillte ccc-DNA langsamer. Die Konzentration der oc-/“nicked“-DNA und der linearen DNA bleibt während der DNA-Gyrase-Behandlung unverändert.

Die Reaktionsansätze wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die monomere ccc-Minicircle-DNA aufgereinigt. Anschließend wurden die unterschiedlichen Topoisomer-Verteilungen in CHO-K1-Suspensionszellen transfiziert. Die EGFP-Expression wurde 1 dpt und 3 dpt gemessen.



**Abbildung 40: EGFP-Expression der CHO-K1-Zellpopulationen 1 dpt mit dem Minicircle SV40GFPS/MAR in unterschiedlicher Topoisomer-Verteilung**

Die Expression von nicht transfizierten CHO-K1-Zellen und den transfizierten Zellpopulationen ist als Dot-Plot-Auftragung dargestellt. Es wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen mit  $1 \mu\text{g}$  Minicircle SV40GFPS/MAR mithilfe von PEI (25 kDa, linear) transfiziert. Die EGFP-Expression wurde durch FACS bestimmt. (A) CHO-K1-Wildtyp-Zellen, (B) CHO-K1-Zellpopulation „+“, die mit religierter positiv verdrillter Minicircle-DNA transfiziert wurde (C) CHO-K1-Zellpopulation „-“, die mit schwach-negativ verdrillter Minicircle-DNA transfiziert wurde (D) CHO-K1-Zellpopulation „-“, die mit mittelstark-negativ verdrillter Minicircle-DNA transfiziert wurde, (E) CHO-K1-Zellpopulation „---“, die mit stark-negativ verdrillter Minicircle-DNA transfiziert wurde. FSC-HLin = Zellgröße, GRN-HLog = EGFP-Fluoreszenz. Die Prozentzahl im Dot-Plot bezieht sich auf die EGFP-exprimierenden Zellen im Kasten (bezogen auf alle detektierten Zellen).

Anhand der aufgenommenen Dot-Plots wird deutlich, dass 1 dpt im Hinblick auf die EGFP-Expression nur geringe Unterschiede zwischen den Transfektionen existieren. Der Anteil der EGFP-exprimierenden Zellen und die mittlere EGFP-Expression sind in Tabelle 15 dargestellt.

Die Transfektionseffizienz (1 dpt) lag zwischen 53,60 % und 60,30 %, wobei mit dem religierten positiv verdrillten Minicircle („+“) und dem schwach-negativ verdrillten Minicircles („-“) die höchste Transfektionseffizienz erreicht werden konnte. Die Viabilität der Zellen war bei allen 4 Transfektionen nahezu gleich.

**Tabelle 15: EGFP-Expression von CHO-K1-Suspensionszellen, die mit dem Minicircle SV40GFPS/MAR in unterschiedlicher Topoisomer-Verteilung transfiziert wurden**

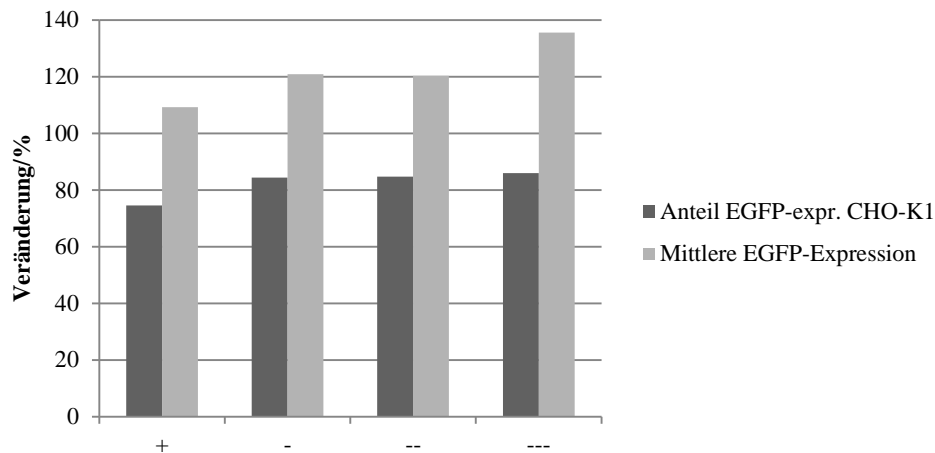
	1 dpt			3 dpt		
	Viable Zellen	Anteil EGFP-expr. Zellen [%]	Mittlere EGFP-Expression [ <i>light units</i> ]	Viable Zellen	Anteil EGFP-expr. Zellen [%]	Mittlere EGFP-Expression [ <i>light units</i> ]
+	1,17×10 <sup>6</sup> (94,20 %)	60,10	1741	1,46×10 <sup>6</sup> (91,10 %)	44,80	1901
-	1,15×10 <sup>6</sup> (93,90 %)	60,30	1723	1,53×10 <sup>6</sup> (92,00 %)	50,90	2083
--	0,97×10 <sup>6</sup> (93,90 %)	53,60	1444	1,24×10 <sup>6</sup> (92,30 %)	45,40	1737
---	1,08×10 <sup>6</sup> (91,60 %)	55,00	1335	1,30×10 <sup>6</sup> (90,50 %)	47,30	1810

Es wurden jeweils 1×10<sup>6</sup> Zellen mit 1 µg Minicircle SV40GFPS/MAR (mit einer unterschiedlichen Topoisomer-Verteilung und vergleichbarer Reinheit) mithilfe von PEI (25 kDa, linear) transfiziert. Die EGFP-Expression wurde 1 und 3 dpt durch FACS bestimmt. + = CHO-K1-Zellpopulation, die mit religierter Minicircle-DNA transfiziert wurde, - = CHO-K1-Zellpopulation, die mit schwach-negativ verdrillter Minicircle-DNA transfiziert wurde, -- = CHO-K1-Zellpopulation, die mit mittelstark-negativ verdrillter Minicircle-DNA transfiziert wurde, --- = CHO-K1-Zellpopulation, die mit stark-negativ verdrillter Minicircle-DNA transfiziert wurde. Die Viabilität der Zellen ist in % bezogen auf alle vermessenen Zellen angegeben. Der Anteil an EGFP-exprimierenden Zellen bezieht sich auf die viablen Zellen. Die mittlere EGFP-Expression stellt den Mittelwert der gemessenen EGFP-Fluoreszenz der EGFP-exprimierenden Zellen dar.

3 dpt ist der Anteil an EGFP-exprimierenden Zellen bei allen Zellpopulationen gesunken, die mittlere EGFP-Expression ist dagegen gestiegen. Die Veränderung des Anteils der EGFP-exprimierenden Zellen und der mittleren EGFP-Expression ist in Abbildung 41 dargestellt.

Bei der Zellpopulation, die mit den religierten positiv verdrillten Minicircles transfiziert wurde („+“), ist zu erkennen, dass der Anteil an EGFP-exprimierenden Zellen nur noch 74 % des ursprünglichen Anteils aufwies. Die anderen Zellpopulationen, die mit DNA-Gyrase-behandelten „*in vitro*“-Minicircles transfiziert wurden, wiesen noch 84-86 % des ursprünglichen Anteils auf. Die mittlere EGFP-Expression ist in allen Zellpopulationen von Tag 1 pt zu Tag 3 pt gestiegen. Den geringsten Anstieg zeigte dabei die Zellpopulation, die

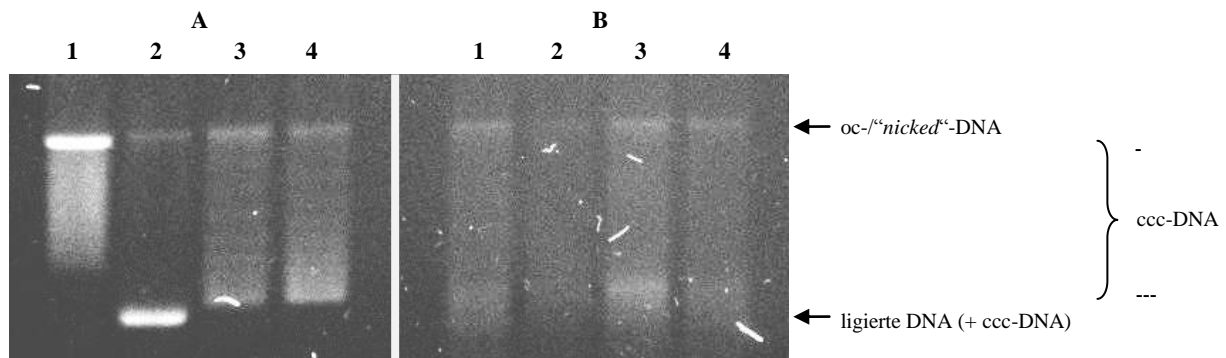
mit den religierten positiv verdrillten Minicircles („+“) transfiziert wurde. Trotzdem zeigte diese Zellpopulation noch die zweithöchste mittlere EGFP-Expression. Den höchsten Anstieg zeigt in diesem Fall die Zellpopulation, die mit stark-negativ verdrilltem Minicircle („---“) transfiziert wurde.



**Abbildung 41: Entwicklung der EGFP-Expression der, mit unterschiedlichen Minicircle-Topoisomeren transfizierten, CHO-K1-Zellpopulationen von Tag 1 pt zu Tag 3 pt (Daten s. Tabelle 15)**

Dargestellt ist der Anteil der EGFP-exprimierenden Zellen und die mittlere EGFP-Expression 3 dpt im Verhältnis zur Messung am Tag 1 pt. Es wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen mit  $1 \mu\text{g}$  Minicircle SV40GFPS/MAR mithilfe von PEI (25 kDa, linear) transfiziert. Die EGFP-Expression wurde 1 und 3 dpt durch FACS bestimmt und zueinander in ein Verhältnis gesetzt. + = CHO-K1-Population, die mit religierter positiv verdrillter Minicircle-DNA transfiziert wurde. - = CHO-K1-Population, die mit schwach-negativ verdrillter Minicircle-DNA transfiziert wurde. -- = CHO-K1-Population, die mit mittelstark-negativ verdrillter Minicircle-DNA transfiziert wurde. --- = CHO-K1-Population, die mit stark-negativ verdrillter Minicircle-DNA transfiziert wurde.

1 dpt wurde die DNA aus einem Teil der transfizierten Zellen präpariert und durch Auftrennung auf einem Chloroquin-Agarosegel die Topoisomer-Verteilung untersucht (Abbildung 42). 1 dpt dominieren zwei DNA-Topoisomerformen, die oc-/“*nicked*“-Form und eine stark-negativ verdrillte Form. Zwischen den beiden DNA-Topoisomerformen ist ein Schmier zu erkennen, der wahrscheinlich durch den Abbau der transfizierten DNA oder durch Verunreinigungen mit genomischer DNA entstanden ist.



**Abbildung 42: Topoisomer-Verteilung des Minicircles SV40GFPS/MAR vor und nach der Transfektion in CHO-K1-Suspensionszellen**

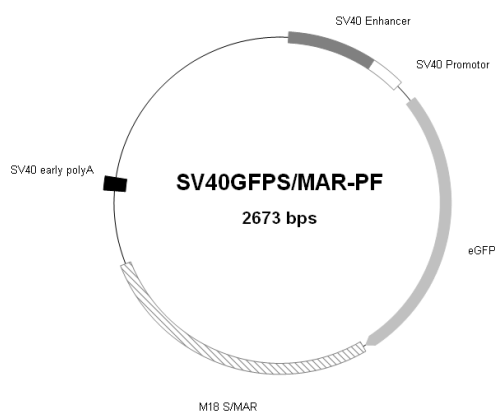
Es wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen mit 1  $\mu\text{g}$  Minicircle SV40GFPS/MAR mithilfe von PEI (25 kDa, linear) transfiziert. 1 dpt wurde die episomale DNA der Zellpopulationen isoliert. Je 200 ng DNA wurden auf einem Chloroquin-Agarosegel (0,8 % (w/v) Agarose) bei  $5 \text{ V cm}^{-1}$  für 2 h aufgetrennt. Das Gel enthielt  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  Chloroquin-Diphosphat. A = Minicircle-DNA vor der Transfektion. B = Minicircle-DNA nach der Transfektion (1 dpt). 1 = Schwach-negativ verdrillte Minicircle-DNA vor und nach der Transfektion. 2 = Ligierte positiv verdrillte Minicircle-DNA vor und nach der Transfektion. 3 = Mittelstark-negativ verdrillte Minicircle-DNA vor und nach der Transfektion, 4 = stark-negativ verdrillte Minicircle-DNA vor und nach der Transfektion. oc = Ringförmige DNA ohne superhelikale Verdrillungen („open circle“-DNA). „nicked“-DNA = Zirkuläre DNA mit einem Einzelstrangbruch. ccc = Superhelikale DNA-Form („covalently closed circular“-DNA). - = Schwach-negativ verdrillte ccc-DNA. --- = Stark-negativ verdrillte ccc-DNA. + ccc-DNA = Positiv verdrillte DNA-Form aus der Ligation mit einer T4-Ligase.

### 3.3. Stabilität, Etablierung und Expressionsverhalten der Minicircle-DNA in CHO-K1-Suspensionszellen

Die Etablierung von zwei unterschiedlichen Minicircles wurde in adhärenenten CHO-K1-Zellen zur Expression von IgG-Molekülen nachgewiesen. Weiterhin konnte die Expression von IgG-Molekülen mit dem entwickelten Coexpressionssystem in CHO-K1-Suspensionszellen gezeigt werden. CHO-Suspensionszellen sind für die industrielle Herstellung von rekombinanten Proteinen von großer Bedeutung. Deshalb sollte die Verwendung der Minicircle-Technologie in diesen Zellen untersucht werden. Dabei sollte die Etablierung der Minicircles in den Zellen und die Langzeitstabilität der Expression aufgenommen werden. Bei der Untersuchung des episomalen Status der Minicircles zur Generierung von IgG-Molekülen in adhärenenten CHO-K1-Zellen wurde beobachtet, dass es neben der episomalen Etablierung der Minicircles zusätzlich zu Integrationen der Minicircles kommen kann. Deshalb sollte versucht werden, durch unterschiedliche Methoden diese illegitime Integration zu blockieren. Weiterhin sollte die Etablierung der Minicircles in einer neu entwickelten Zelllinie, der CAP-Zelllinie, untersucht werden.

### 3.3.1. Expressionsverhalten und Stabilität von CHO-K1-Einzelklonen mit Minicircle-DNA

In adhärennten CHO-K1-Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass neben der episomalen Etablierung zusätzlich eine illegitime Integration der Minicircles stattfindet. Um die Etablierung der Minicircle-DNA und die Langzeitexpression mit Minicircle-DNA in CHO-K1-Zellen zu untersuchen, wurde ausschließlich der kommerziell erhältliche Minicircle SV40GFPS/MAR mit dem SAR M18 (PlasmidFactory, Bielefeld) verwendet (Abbildung 43).

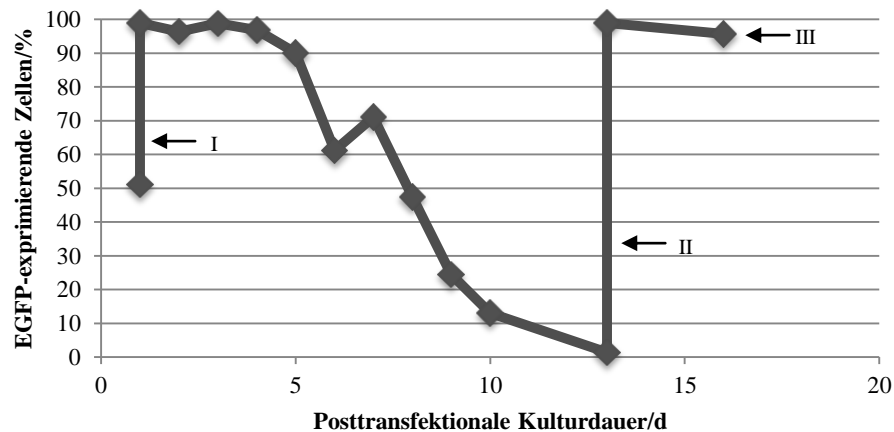


**Abbildung 43: Vektorkarte des Minicircles SV40GFPS/MAR von PlasmidFactory**

Der kommerziell erhältliche Minicircle enthält eine EGFP-Expressionskassette mit dem S/MAR M18 und einer SV40-Polyadenylierungsstelle strangabwärts des EGFP-Gens. Die Transkription wird durch einen SV40-Promotor gesteuert. PF = PlasmidFactory.

Nach Transfektion des Minicircles SV40GFPS/MAR mithilfe von PEI (25 kDa, linear) wurden die EGFP-exprimierenden Zellen 1 d und 13 d später durch FACS selektiert. 16 dpt wurde eine Einzelzellklonierung mittels „*limiting dilution*“ durchgeführt (Abbildung 44).

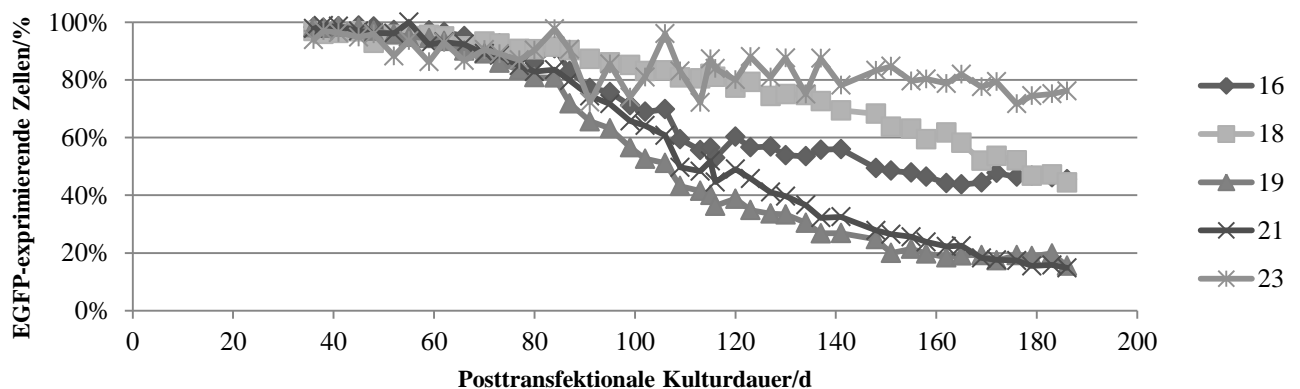




**Abbildung 44:** Anteil an EGFP-exprimierenden Zellen in einer CHO-K1-Zellpopulation nach der Transfektion mit dem Minicircle SV40GFPS/MAR während einer 16tägigen Kultivierung

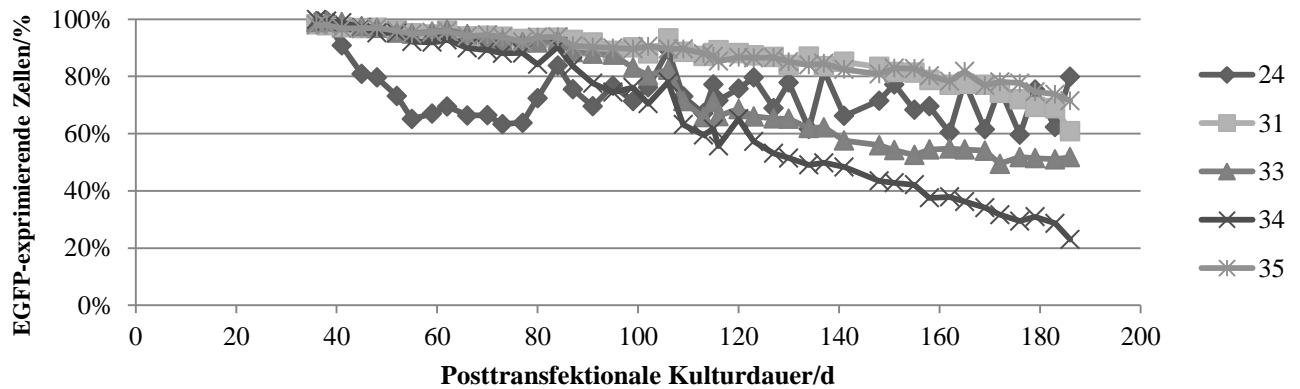
Es wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen mit  $1 \mu\text{g}$  SV40GFPS/MAR transfiziert. Die Transfektion erfolgte mithilfe von PEI (25 kDa, linear) in einem Verhältnis PEI:DNA von 3:1. 1 dpt (I) und 13 dpt (II) wurden die EGFP-exprimierenden Zellen durch FACS selektiert und weiterkultiviert. 16 dpt wurde eine Einzelzellklonierung mittels „limiting dilution“ durchgeführt (III).

Für die Einzelzellklonierung mittels „limiting dilution“ wurden theoretisch 1920 Einzelklone in 384-Lochplatten ausgesät und über 12 Tage kultiviert. Es konnten 43 Einzelklonpopulationen detektiert werden, von denen 10 weiterkultiviert werden konnten. Um die Stabilität der Expression mit Minicircles zu überprüfen, wurde die EGFP-Expression dieser 10 Einzelklonpopulationen von Tag 36 pt über einen Zeitraum von 150 Tagen gemessen (Abbildung 45 und Abbildung 46).



**Abbildung 45:** Anteil an EGFP-exprimierenden Zellen in den Einzelzellpopulationen „16“, „18“, „19“, „21“ und „23“ nach Transfer des Minicircles SV40GFPS/MAR

Es wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen mit  $1 \mu\text{g}$  SV40GFPS/MAR transfiziert. 10 Einzelzellpopulationen, von denen hier 5 dargestellt sind, konnten kultiviert werden und wurden ab dem Tag 36 pt auf ihre EGFP-Expression untersucht. Die Subkultivierung der Einzelklonpopulationen erfolgte alle 3-4 Tage.

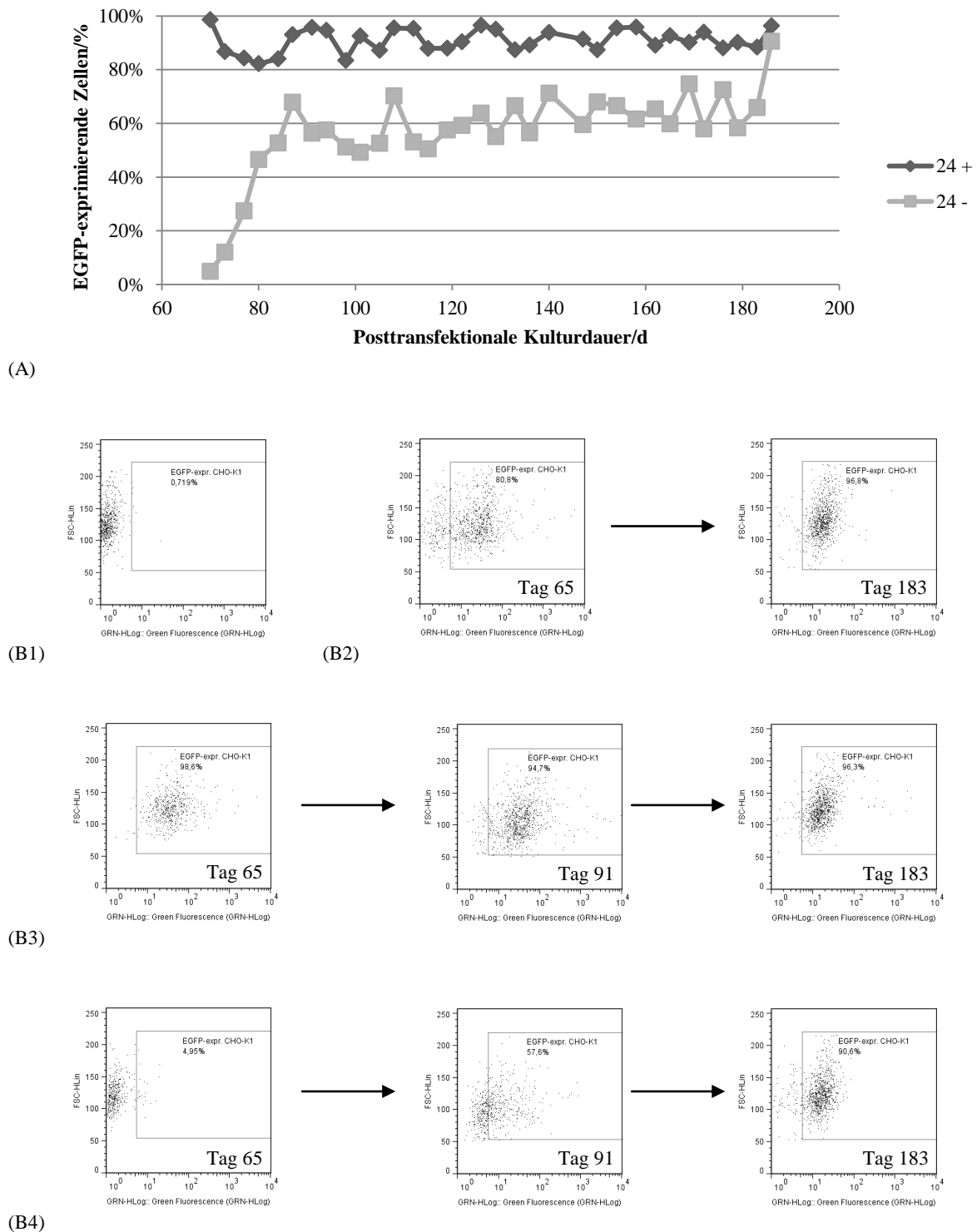


**Abbildung 46: Anteil an EGFP-exprimierenden Zellen in den Einzelzellpopulationen „24“, „31“, „33“, „34“ und „35“ nach Transfer des Minicircles SV40GFPS/MAR**

Es wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen mit  $1 \mu\text{g}$  SV40GFPS/MAR transfiziert. 10 Einzelzellpopulationen, von denen hier 5 dargestellt sind, konnten kultiviert werden und wurden ab dem Tag 36 pt auf ihre EGFP-Expression untersucht. Die Subkultivierung der Einzelklonpopulationen erfolgte alle 3-4 Tage.

Der Anteil der EGFP-exprimierenden Zellen sinkt in allen untersuchten Einzelklonpopulationen über die Zeit mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. In den Einzelklonpopulationen „19“, „21“ und „34“ sinkt der Anteil an EGFP-exprimierenden Zellen am schnellsten, wohingegen der Anteil in den Einzelklonpopulationen „23“ und „24“ langsamer sinkt. Die Einzelklonpopulation „24“ zeigte überdies bis zum Tag 80 pt einen schnellen Abfall des Anteils an EGFP-exprimierenden Zellen, danach schwankte der Anteil zwischen 60-80 %.

Die Abnahme des Anteils an EGFP-exprimierenden Zellen kann durch den Verlust der episomalen Minicircles, durch nicht-funktionelle Integration des Minicircles in das Wirtsgenom oder durch eine epigenetische Inaktivierung bzw. positionsabhängige Expression der episomalen oder integrierten Minicircles hervorgerufen werden. Um dies zu überprüfen, wurden die Einzelklonpopulationen „24“ und „34“ 65 dpt erneut auf ihre EGFP-Expression durch FACS sortiert. Die Einzelklonpopulation „24“ wurde in EGFP-exprimierende („24+“) und -nicht-exprimierende Zellen („24-“) getrennt, die Einzelklonpopulation „34“ wurde in hoch- („34++“) und mittel-exprimierende Zellen („34+“) getrennt. Bei einer positionsabhängigen Expression des episomalen Minicircles bzw. bei einer Neuordnung der episomalen Minicircles während der Replikation und Zellproliferation müssten nicht- bzw. schwach-exprimierende Zellen nach entsprechender Kultivierung erneut eine verstärkte Expression zeigen und umgekehrt. In Abbildung 47 und Tabelle 16 ist die Entwicklung der EGFP-Expression der Einzelklonpopulationen „24+“ und „24-“ über die Zeit von 118 Tagen dargestellt.



**Abbildung 47: Anteil an EGFP-exprimierenden Zellen in der Einzelzellpopulation „24“ und den daraus sortierten Zellpopulationen „24+“ und „24-“**

(A) Aus der Einzelklonpopulation „24“ wurde 65 dpt eine EGFP-exprimierende („24+“) und -nicht-exprimierende Zellpopulation („24-“) durch FACS sortiert. Diese beiden Zellpopulationen wurden anschließend auf ihre EGFP-Expression untersucht. Die Subkultivierung der Einzelklonpopulationen erfolgte alle 3-4 Tage. (B) Die Expression von nicht-transfizierten CHO-K1-Zellen und den Zellpopulationen ist als Dot-Plot dargestellt. Die EGFP-Expression wurde jeweils 65, 91 und 183 dpt bestimmt. (B1) CHO-K1-Wildtyp-Zellen, (B2) Entwicklung des Expressionsverhaltens der, für die Sortierung verwendeten, CHO-K1-Zellpopulation „24“ über die Zeit. (B3) Entwicklung des Expressionsverhaltens der CHO-K1-

Zellpopulation „24+“ nach der Sortierung. (B4) Entwicklung des Expressionsverhaltens der CHO-K1-Zellpopulation „24-“ nach der Sortierung. FSC-HLin = Zellgröße, GRN-HLog = EGFP-Fluoreszenz. Die Prozentzahl im Dot-Plot zeigt den Anteil an EGFP-exprimierenden Zellen bezogen auf alle detektierten, viablen Zellen.

Der Anteil an EGFP-exprimierenden Zellen variiert bei der Zellpopulation „24+“ nur gering (Tabelle 16). In der Zellpopulation „24-“ steigt der Anteil der EGFP-exprimierenden Zellen über die Zeit, obwohl der Anteil an EGFP-exprimierenden Zellen in dieser Zellpopulation nach der Sortierung (65 dpt) sehr gering (4,95 %) war. Im Laufe der Zeit bzw. der Subkultivierungen steigt der Anteil bei dieser Zellpopulation an, sodass beide Zellpopulationen am Ende der Messung annähernd denselben Anteil an EGFP-exprimierenden Zellen aufweisen. Die Entwicklung der beiden Zellpopulationen ist ebenfalls im Dot-Plot zu erkennen. Beide Zellpopulationen besitzen 183 dpt eine ähnliche Verteilung an EGFP-exprimierenden Zellen, obwohl sie 65 dpt und 91 dpt unterschiedliche Expressionsverhalten zeigten. Der Anteil der EGFP-exprimierenden Zellen der Zellpopulation „24+“ 183 dpt entspricht zudem dem Anteil der Ursprungszellpopulation „24“, in der der Anteil der EGFP-exprimierenden Zellen ebenfalls von 80,80 % (65 dpt) auf 96,80 % (183 dpt) gestiegen ist.

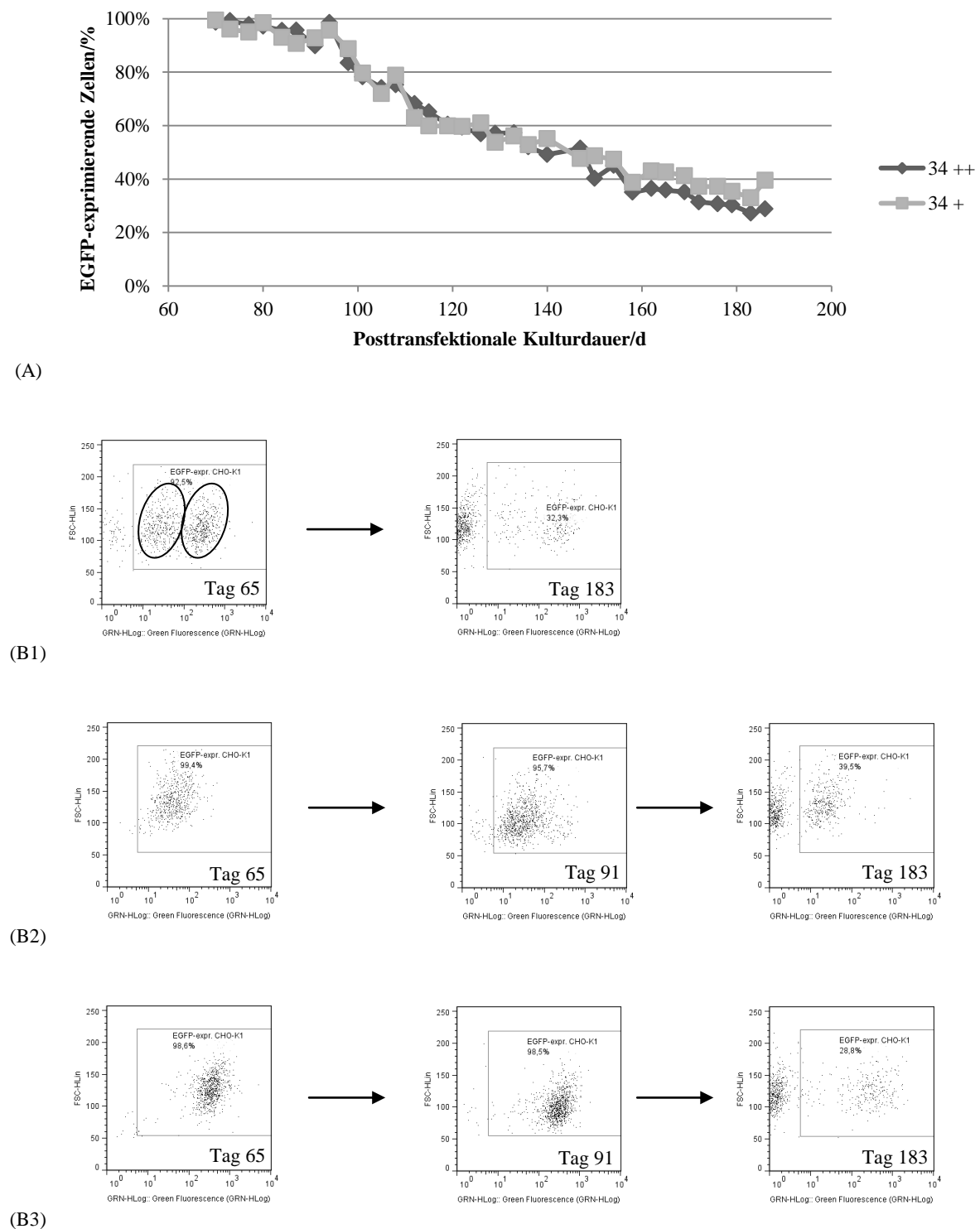
**Tabelle 16: EGFP-Expression der CHO-K1-Einzelklonpopulationen „24“ und den daraus sortierten Zellpopulationen „24+“ und „24-“ über einen Zeitraum von 118 Tagen**

	65 dpt		91 dpt		183 dpt	
	Anteil EGFP- expr. Zellen [%]	Mittlere EGFP- Expression [light units]	Anteil EGFP- expr. Zellen [%]	Mittlere EGFP- Expression [light units]	Anteil EGFP- expr. Zellen [%]	Mittlere EGFP- Expression [light units]
<b>24</b>	80,80	70	96,10	92	96,80	22
<b>24+</b>	98,60	70	94,70	93	96,30	30
<b>24-</b>	4,95	9	57,60	34	90,60	19

Es wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen mit 1  $\mu$ g Minicircle SV40GFPS/MAR mithilfe von PEI (25 kDa, linear) transfiziert. 1 und 13 dpt wurden die EGFP-exprimierenden Zellen durch FACS sortiert und weiterkultiviert. 16 dpt wurde eine Einzelzellklonierung mittels „limiting dilution“ durchgeführt. Aus der Einzelklonpopulation 24 wurde 65 dpt eine EGFP-exprimierende („24+“) und -nicht-exprimierende Zellpopulation („24-“) durch FACS sortiert. Diese beiden Zellpopulationen wurden anschließend auf ihre EGFP-Expression untersucht. Der Anteil an EGFP-exprimierenden Zellen bezieht sich auf die viablen Zellen. Die mittlere EGFP-Expression stellt den Mittelwert der gemessenen EGFP-Fluoreszenz dar.

Im Vergleich zur Einzelklonpopulation „24“ wurden 65 dpt aus der Einzelklonpopulation „34“ stark- und schwach-exprimierende Zellen durch FACS sortiert. Der Anteil der EGFP-

exprimierenden Zellen und die Verteilung der EGFP-Expression sind in Abbildung 48 und Tabelle 17 dargestellt.



**Abbildung 48: Anteil an EGFP-exprimierenden Zellen in der Einzelzellpopulation „34“ und den daraus sortierten Zellpopulationen „34++“ und „34+“**

(A) Aus der Einzelklonpopulation „34“ wurde 65 dpt eine stark-exprimierende („34++“) und schwach-exprimierende Zellpopulation („34+“) durch FACS sortiert. Diese beiden Zellpopulationen wurden anschließend auf ihre EGFP-Expression untersucht. Die Subkultivierung der Einzelklonpopulationen erfolgte alle 3-4 Tage. (B) Die Expression der Zellpopulationen

ist als Dot-Plot dargestellt. Die EGFP-Expression wurde jeweils 65, 91 und 183 dpt bestimmt. (B1) CHO-K1-Zellpopulation „34“ 65 dpt und 183 dpt. Es sind die sortierten Zellpopulationen markiert. (B2) Entwicklung des Expressionsverhaltens der CHO-K1-Zellpopulation „34+“ nach der Sortierung. (B3) Entwicklung des Expressionsverhaltens der CHO-K1-Zellpopulation „34++“ nach der Sortierung. FSC-HLin = Zellgröße, GRN-HLog = EGFP-Fluoreszenz. Die Prozentzahl im Dot-Plot zeigt den Anteil an EGFP-exprimierenden Zellen bezogen auf alle detektierten, viablen Zellen.

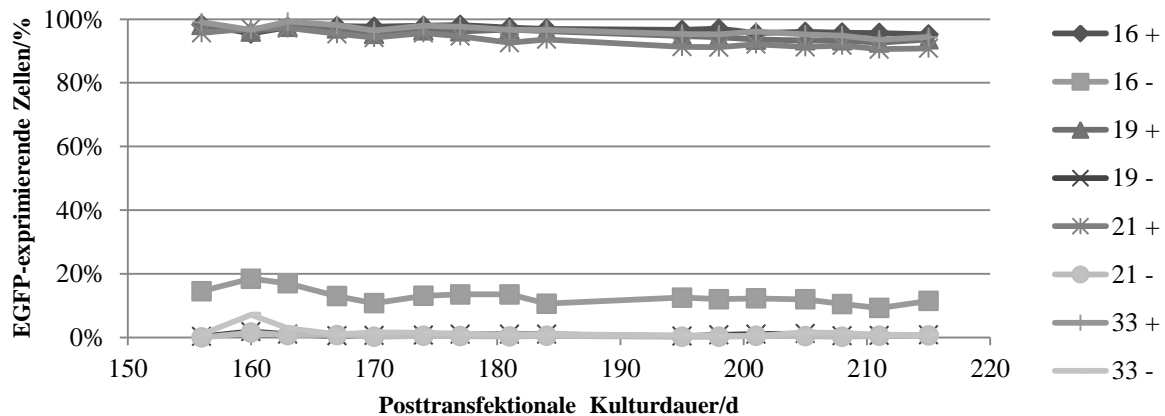
Die Einzelklonpopulation „34“ hat sich 65 dpt in eine stark- und eine schwach-exprimierende Zellpopulation geteilt. Diese beiden Populationen wurden getrennt und über die Zeit kultiviert. Der Anteil der EGFP-exprimierenden Zellen in der Zellpopulation „34“ und den daraus sortierten Zellpopulationen „34+“ und „34++“ sinkt mit der Zeit auf 28,80-39,50 %. In den Dot-Plots ist bei beiden Zellpopulationen die Entstehung einer nicht-exprimierenden Population von Tag 65 pt zum Tag 183 pt zu erkennen. Obwohl der Anteil an EGFP-exprimierenden Zellen bei beiden Zellpopulationen parallel sinkt, bleibt die mittlere EGFP-Expression der beiden Populationen unterschiedlich.

**Tabelle 17: EGFP-Expression der CHO-K1-Einzelklonpopulationen „34“ und den daraus sortierten Zellpopulationen „34+“ und „34++“ über einen Zeitraum von 118 Tagen**

	65 dpt		91 dpt		183 dpt	
	<b>Anteil EGFP- expr. Zellen [%]</b>	<b>Mittlere EGFP- Expression [light units]</b>	<b>Anteil EGFP- expr. Zellen [%]</b>	<b>Mittlere EGFP- Expression [light units]</b>	<b>Anteil EGFP- expr. Zellen [%]</b>	<b>Mittlere EGFP- Expression [light units]</b>
34	92,5	203	97,10	203	32,30	303
34++	98,60	410	98,50	333	28,80	423
34+	99,40	57	95,70	60	39,50	48

Es wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen mit 1 µg Minicircle SV40GFPS/MAR mithilfe von PEI (25 kDa, linear) transfiziert. 1 und 13 dpt wurden die EGFP-exprimierenden Zellen durch FACS sortiert und weiterkultiviert. 16 dpt wurde eine Einzelzellklonierung mittels „limiting dilution“ durchgeführt. Aus der Einzelklonpopulation „34“ wurde 65 dpt eine stark-exprimierende („34++“) und eine schwach-exprimierende Zellpopulation („34+“) durch FACS sortiert. Diese beiden Zellpopulationen wurden anschließend auf ihre EGFP-Expression untersucht. Der Anteil an EGFP-exprimierenden Zellen bezieht sich auf die viablen Zellen. Die mittlere EGFP-Expression stellt den Mittelwert der gemessenen EGFP-Fluoreszenz der viablen, detektierten Zellen dar.

Wie an den Einzelklonen „24“ und „34“ zu erkennen ist, scheint die Etablierung der Minicircles sogar 16 dpt noch nicht abgeschlossen zu sein.

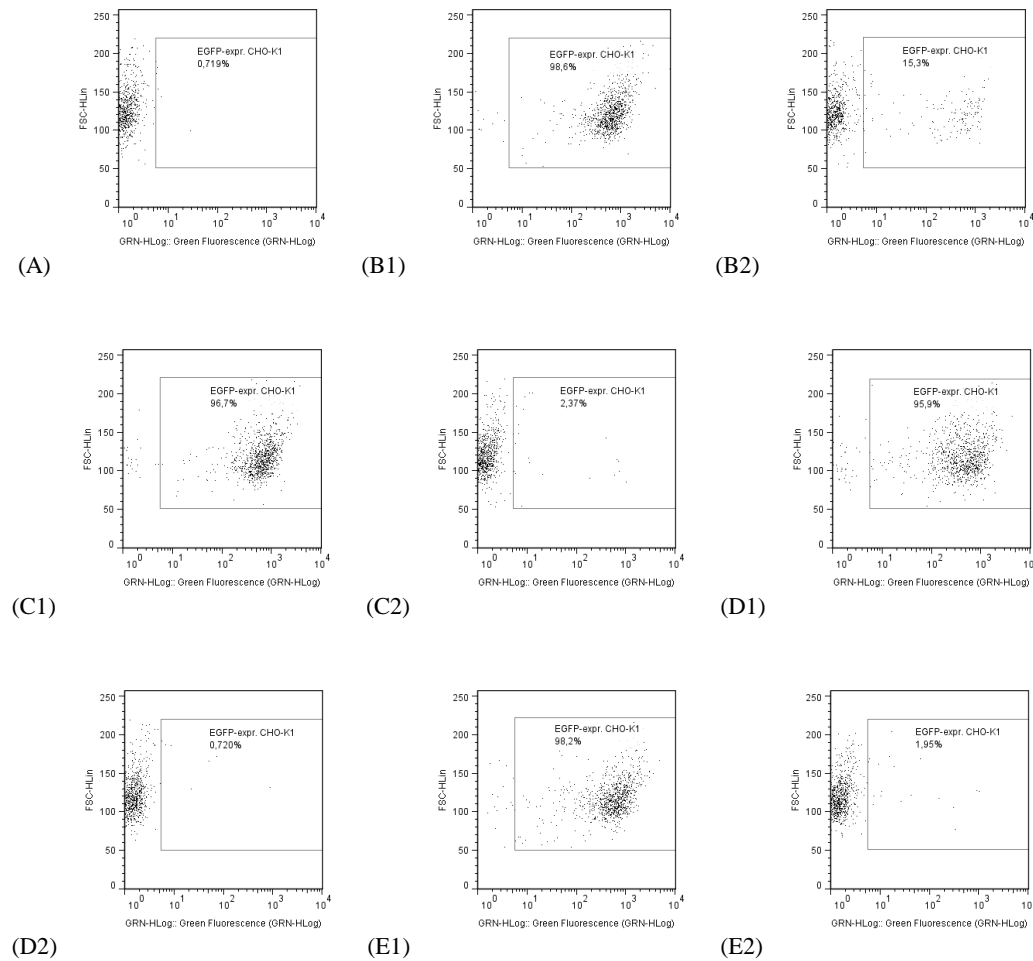


**Abbildung 49: Anteil an EGFP-exprimierenden Zellen in den Zellpopulationen „16+/-“, „19+/-“, „21+/-“ und „33+/-“ nach der 3. Sortierung durch FACS**

Aus den jeweiligen Einzelklonpopulationen wurden 155 dpt eine EGFP-exprimierende und eine -nicht-exprimierende Zellpopulation durch FACS sortiert. Die Zellpopulationen wurden anschließend auf ihre EGFP-Expression untersucht. Die Subkultivierung erfolgte alle 3-4 Tage. „+“ = EGFP-exprimierende Zellpopulation, „-“ = nicht-exprimierende Zellpopulation.

Um zu überprüfen, ob zu einem späten Zeitpunkt ebenfalls eine Änderung des Expressionsverhaltens zu beobachten ist, wurden die Einzelklonpopulationen „16“, „19“, „21“ und „33“ 155 dpt erneut auf ihre EGFP-Expression durch FACS sortiert. Dabei wurde jeweils eine EGFP-exprimierende und eine -nicht-exprimierende Population sortiert (Abbildung 49 und Abbildung 50). Bei einer instabilen Etablierung des Minicircles bzw. bei einer Neuordnung der Minicircles während der Replikation müsste die EGFP-Expression gewissen Schwankungen unterworfen sein.

Der Anteil der EGFP-exprimierenden Zellen bleibt in den untersuchten Zellpopulationen über einen Zeitraum von 2 Monaten stabil (Abbildung 49). Außer bei der Zellpopulation „16-“ zeigen alle Dot-Plots jeweils nur eine Zellpopulation, d.h. nach 2 Monaten ist keine zusätzliche Population entstanden (Abbildung 50). Die EGFP-exprimierende Population bei „16-“ ist auf eine fehlerhafte Sortierung zurückzuführen, da diese Population direkt nach der Sortierung vorhanden war.

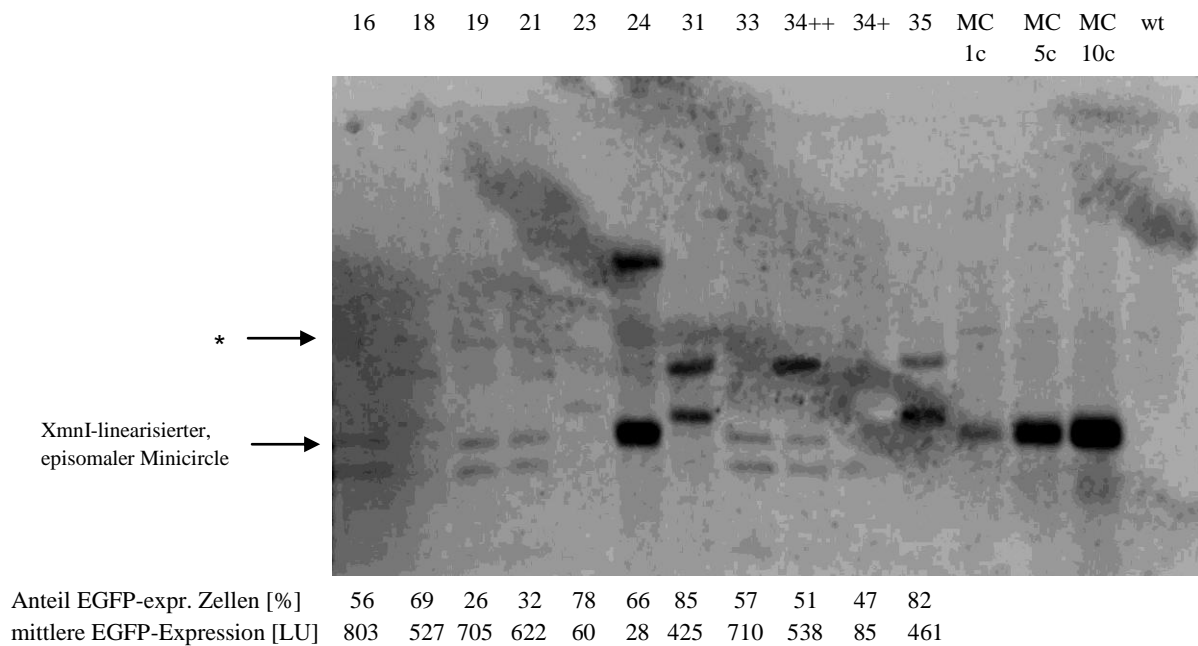


**Abbildung 50: EGFP-Expression der Zellpopulationen „16+/-“, „19+/-“, „21+/-“, „33+/-“ nach der 3. Sortierung durch FACS**

Die Expression von nicht transfizierten CHO-K1-Zellen und den Zellpopulationen ist als Dot-Plot dargestellt. Die EGFP-Expression wurde 215 dpt durch FACS bestimmt. (A) CHO-K1-Wildtyp-Zellen. (B1) CHO-K1-Zellpopulation „16+“. (B2) CHO-K1-Zellpopulation „16-“. (C1) CHO-K1-Zellpopulation „19+“. (C2) CHO-K1-Zellpopulation „19-“. (D1) CHO-K1-Zellpopulation „21+“. (D2) CHO-K1-Zellpopulation „21-“. (E1) CHO-K1-Zellpopulation „33+“. (E2) CHO-K1-Zellpopulation „33-“. FSC-HLin = Zellgröße. GRN-HLog = EGFP-Fluoreszenz. Die Prozentzahl im Dot-Plot zeigt den Anteil an EGFP-exprimierenden Zellen bezogen auf alle detektierten, viablen Zellen.

Ob der Minicircle in das Genom integriert oder episomal vorliegt, wurde durch die Isolation der Gesamt-DNA der Zellpopulationen mit anschließender Southern-Blot-Analyse untersucht (Abbildung 51).



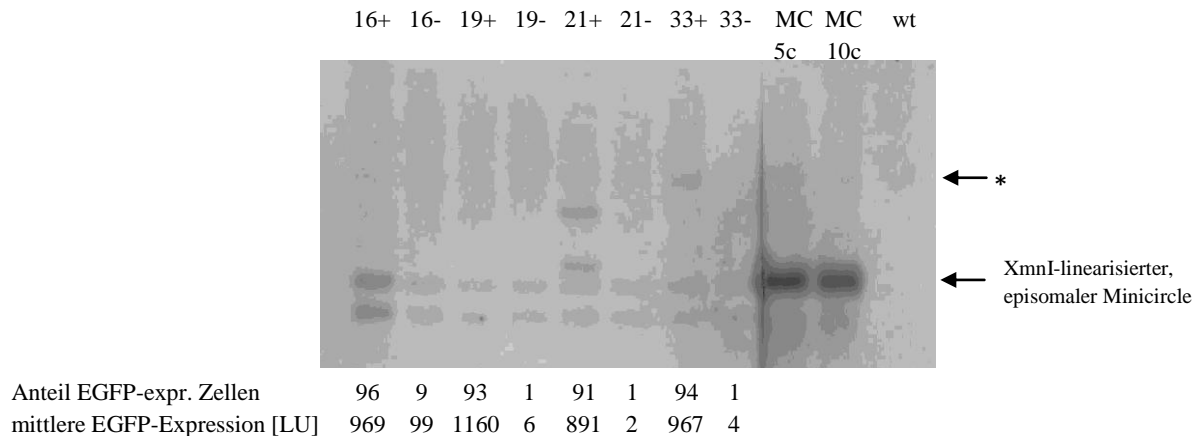


**Abbildung 51: Southern-Blot-Analyse mit XmnI-linearisierter Gesamt-DNA der Zellpopulationen, die mit dem Minicircle SV40GFPS/MAR transfiziert wurden**

10 µg der Gesamt-DNA des jeweiligen CHO-K1-Zellklons bzw. CHO-K1-Wildtyps wurden mit dem Restriktionsenzym XmnI geschnitten. Der Minicircle wurde dadurch linearisiert und die genomische DNA fragmentiert. Für die Hybridisierung im Southern Blot wurde eine EGFP-S/MAR-Sonde verwendet. Es wurde zur Bestimmung des episomalen Minicircles eine Kontrolle, bestehend aus CHO-Wildtyp-DNA und SV40GFPS/MAR mitgeführt. Die mittlere EGFP-Expression und der Anteil der EGFP-exprimierenden Zellen in der jeweiligen Zellpopulation 180 dpt ist jeweils unter jeder Spalte angegeben. „16“, „18“, „19“, „21“, „23“, „24“, „33“, „34++“ und „34+“ = Bezeichnung der Einzelklonpopulationen. „MC 1c“ = DNA aus CHO-K1-Wildtyp-Zellen mit 1 Kopie Minicircle-DNA pro Zelle. „MC 5c“ = DNA aus CHO-K1-Wildtyp-Zellen mit 5 Kopien Minicircle-DNA pro Zelle. „MC 10c“ = DNA aus CHO-K1-Wildtyp-Zellen mit 10 Kopien Minicircle-DNA pro Zelle. „wt“ = DNA aus CHO-K1-Wildtyp-Zellen. \* = Spezifisches Signal, dass durch den Minicircle hervorgerufen wird, da dieses Signal auch in den Positivkontrollen (MC 1c - MC 10c) vorkommt. LU = *light units*.

Es konnte in allen untersuchten Zellklonpopulationen Minicircle-DNA nachgewiesen werden. Die Populationen „16“, „18“, „19“, „21“, „23“, „24“, „33“, „34++“ und „34+“ zeigen im Southern Blot eine episomale Minicircle-Bande. Darüber hinaus zeigen diese Zellklonpopulationen jedoch zusätzliche Banden, die auf eine Integration des Minicircles oder eine Deletion innerhalb des Minicircles schließen lassen.

Um Unterschiede zwischen den Zellpopulationen, die an Tag 155 sortiert wurden, festzustellen, wurde die Gesamt-DNA der Zellen 211 dpt ebenfalls isoliert und durch eine Southern-Blot-Analyse untersucht.



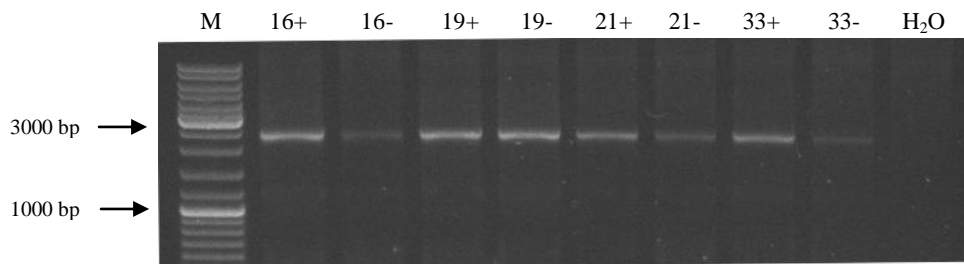
**Abbildung 52: Southern Blot-Analyse mit XmnI-linearisierter Gesamt-DNA der Zellpopulationen, die 155 dpt erneut durch FACS sortiert wurden**

Durchführung wie in Abbildung 51. Es wurde zur Bestimmung des episomalen Minicircles eine Kontrolle, bestehend aus CHO-Wildtyp-DNA und SV40GFPS/MAR mitgeführt. Die mittlere EGFP-Expression und der Anteil der EGFP-exprimierenden Zellen an der jeweiligen Zellpopulation 215 dpt ist jeweils unter jeder Spalte angegeben. „16+“, „33-“ = Bezeichnung der Einzelklonpopulationen. „MC 1c“ = DNA aus CHO-K1-Wildtyp-Zellen mit 1 Kopie Minicircle-DNA pro Zelle. „MC 5c“ = DNA aus CHO-K1-Wildtyp-Zellen mit 5 Kopien Minicircle-DNA pro Zelle. „MC 10c“ = DNA aus CHO-K1-Wildtyp-Zellen mit 10 Kopien Minicircle-DNA pro Zelle. „wt“ = DNA aus CHO-K1-Wildtyp-Zellen. \* = Spezifisches Signal, dass durch den Minicircle hervorgerufen wird, da dieses Signal auch in den Positivkontrollen (MC 1c - MC 10c) vorkommt. LU = light units.

Alle untersuchten Zellpopulationen enthalten episomale Minicircle-DNA. Außerdem sind jeweils zusätzliche Signale zu erkennen. Bei den Zellpopulationen 16, 19 und 33 ist zwischen den exprimierenden und nicht-exprimierenden Zellen kein Unterschied im Bandenmuster zu erkennen. Bei diesen Klonen kann somit nicht anhand des Bandenmusters auf die Expression geschlossen werden. Nur bei der Zellpopulation 21 sind bei den exprimierenden Zellen („21+“) zwei zusätzliche Banden, d.h. Integrationen zu erkennen, sodass möglicherweise die Expression in diesem Fall zusätzlich von den integrierten Minicircles kommt.

### 3.3.2. Methylierungsstudien mit Minicircle-DNA in CHO-K1-Zellen

Die Southern Blot-Analyse zeigte, dass auch nicht-exprimierenden Zellen episomale Minicircles enthalten können. Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurde mit der Gesamt-DNA der in Abbildung 52 untersuchten Zellpopulationen eine PCR durchgeführt. Die Primer wurden dabei so gewählt, dass nahezu der gesamte Minicircle amplifiziert wird („Full-length PCR“).

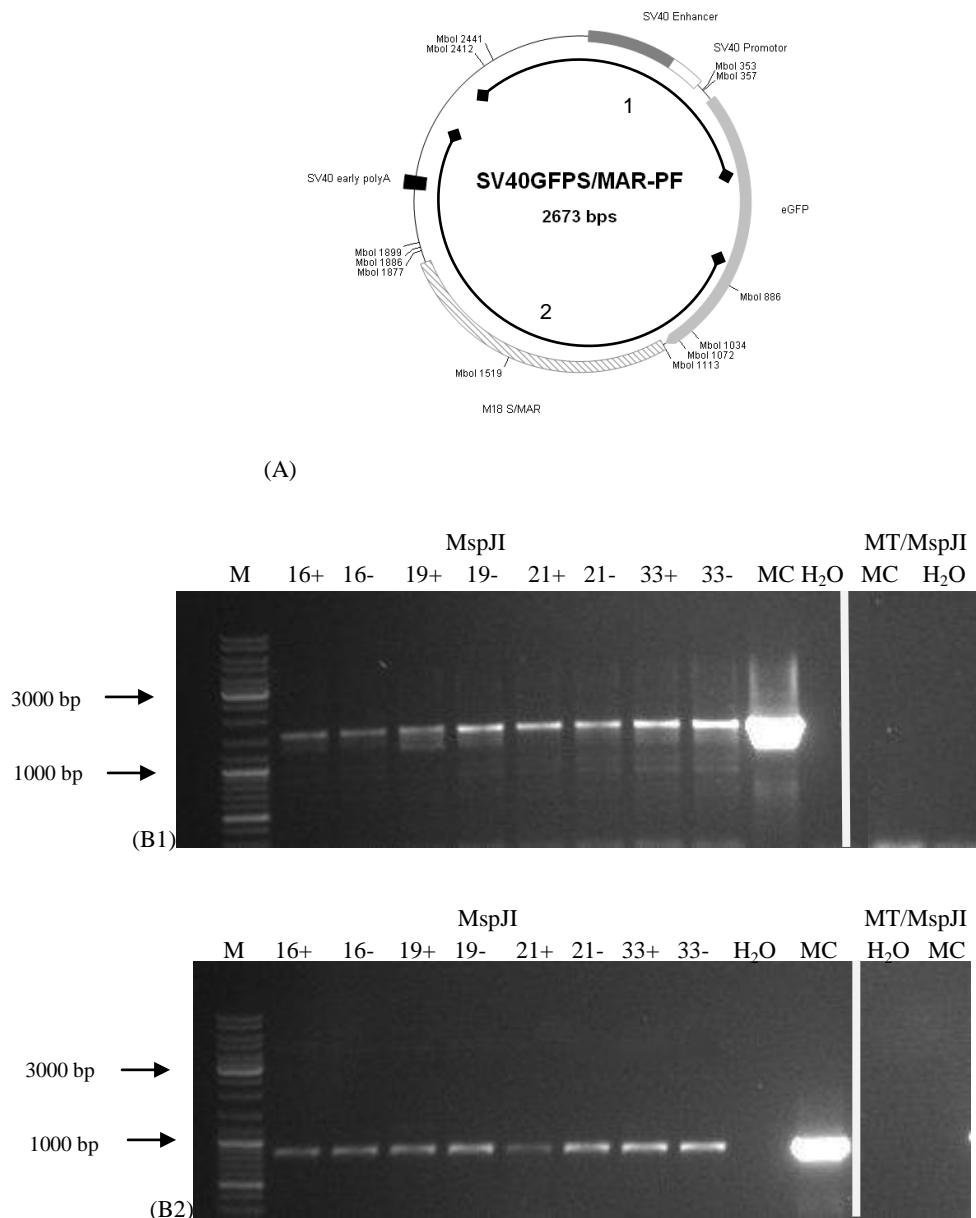


**Abbildung 53: Überprüfung der Gesamt-DNA der 3x sortierten Zellklonpopulationen auf episomale Minicircles durch PCR**

Aus Einzelklonpopulationen wurden 155 dpt eine EGFP-exprimierende und eine -nicht-exprimierende Zellpopulation durch FACS sortiert. 211 dpt wurde die Gesamt-DNA der Zellpopulationen isoliert und durch PCR auf das Vorhandensein von episomaler Minicircle-DNA überprüft. Durch die gewählten Primer wird nahezu der gesamte Minicircle amplifiziert. Es wurden die Primer EPIGFPM18LC/HCfw und EPIGFPM18LC/HCreV verwendet. Für die PCR wurden jeweils 100 ng Gesamt-DNA verwendet. Das entstehende Amplifikat soll dabei 2458 bp lang sein. Die entstehenden PCR-Amplifikate wurden anschließend auf einem Agarosegel (1 % (w/v) Agarose) gelelektrophoretisch aufgetrennt. M = 1 kbp DNA-Leiter (lineare DNA). „16+“-„33+“ = Gesamt-DNA aus der jeweiligen Zellpopulation. H<sub>2</sub>O = Wasserkontrolle ohne DNA.

Bei der durchgeführten PCR ist bei allen Zellklonpopulationen das erwartete Amplifikat (2458 bp) entstanden. Wie bereits durch die Southern-Blot-Analyse (Abbildung 52) nachgewiesen, enthalten also die exprimierenden und nicht-exprimierenden Zellklonpopulationen episomale Minicircle-DNA.

Um zu untersuchen, ob die Minicircles in den nicht-exprimierenden Zellen dem zellulären „*silencing*“ durch DNA-Methylierung unterliegen, wurde die Gesamt-DNA aus den exprimierenden und nicht-exprimierenden Zellen isoliert und mit dem Restriktionsenzym MspJI behandelt. Die Restriktion mit diesem Enzym setzt voraus, dass die Erkennungsstelle und somit die DNA methyliert ist, da nicht-methylierte DNA von diesem Enzym nicht erkannt wird. Die Erkennungssequenz des Enzyms (5'-<sup>m</sup>CNNR-3', R = A oder G) kommt 63× im verwendeten Minicircle SV40GFPS/MAR vor. Im Falle einer Methylierung sollte somit bei einer folgenden PCR auf den gesamten Minicircle kein Amplifikat entstehen. Um methylierte Bereiche des Minicircles besser identifizieren zu können, wurden jeweils 2 PCRs, deren Amplifikate zusammen den gesamten Minicircle abdecken, durchgeführt. Als Kontrolle für die Funktion des Restriktionsenzym MspJI wurde Minicircle-DNA vor dem Restriktionsverdau mit einer CpG-Methyltransferase (M.SssI) behandelt, sodass dieser methylierte Minicircle durch das Restriktionsenzym geschnitten werden sollte.

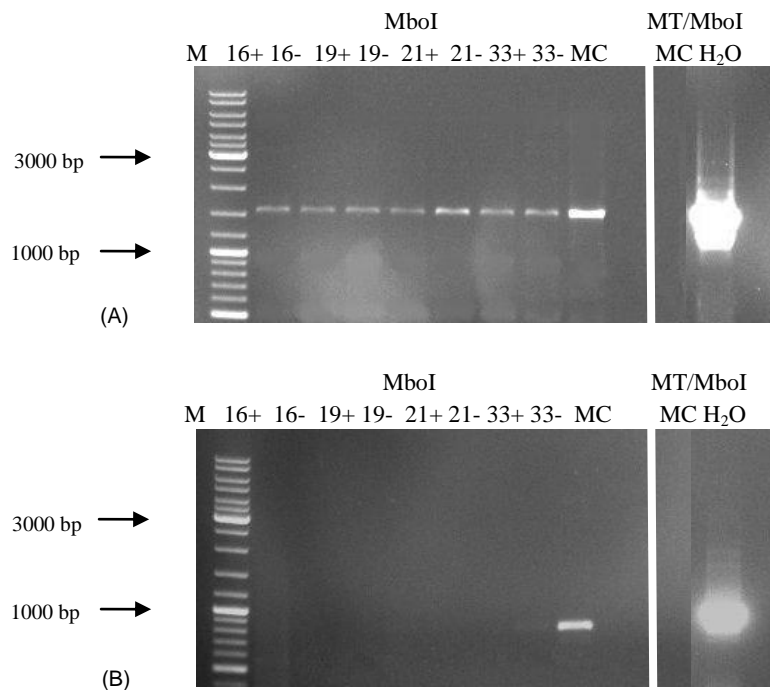


**Abbildung 54: Überprüfung der Methylierung der Minicircle-DNA in CHO-K1-Zellen durch Restriktion mit dem Enzym MspJI und partieller PCR**

(A) Vektorkarte des Minicircles SV40GFPS/MAR mit den PCR-Amplifikaten zur Untersuchung der Methylierung der Minicircles in CHO-K1-Zellen und mit den Erkennungsstellen des Restriktionsenzym MboI. Der kommerziell erhältliche Minicircle enthält eine EGFP-Expressionskassette mit dem SAR M18 und einer SV40-Polyadenylierungsstelle strangabwärts des EGFP-Gens. Die Transkription wird durch einen SV40-Promotor gesteuert. PF = PlasmidFactory. 1 = Ein 846 bp-PCR-Amplifikat entsteht bei PCR-Amplifikation mit den Primern EPIGFPM18LC/HCreV und SV40GFP2\_fw. 2 = Ein 1542 bp-PCR-Amplifikat entsteht bei PCR-Amplifikation mit den Primern EPIGFPM18LC/HCFw und SV40GFP2\_rev. (B) 1 µg der isolierten Gesamt-DNA der Zellpopulationen wurde zunächst mit 5 U MspJI für 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die enzymatische Reaktion abgestoppt und die DNA aufgereinigt. Die partielle PCR wurde jeweils mit 100 ng Gesamt-DNA durchgeführt. Die entstehenden PCR-Amplifikate wurden anschließend auf einem Agarosegel (1 % (w/v) Agarose) gelelektrophoretisch aufgetrennt. (B1) PCR zur Amplifikation der Region 2 (1542 bp). (B2) PCR zur Amplifikation der Region 1 (846 bp). M = 1 kbp DNA-Leiter (lineare DNA). „16+“, „19+“, „21+“, „33+“ = Mit MspJI behandelte Gesamt-DNA aus der

jeweiligen Zellpopulation. MC = Minicircle SV40GFPS/MAR, für die PCR wurde 1 µg DNA eingesetzt. H<sub>2</sub>O = Wasserkontrolle ohne DNA. MT/MspJI = 1 µg Minicircle SV40GFPS/MAR wurde für 2 h mit 1 U CpG-Methyltransferase behandelt, aufgereinigt und anschließend in einer Restriktionsreaktion mit dem Enzym MspJI (1 U) für 2 h inkubiert. Anschließend wurde die DNA aufgereinigt und eine partielle PCR mit 1 µg DNA durchgeführt. Es ist in diesem Fall kein Amplifikat entstanden, da die methylierte Minicircle-DNA durch das Restriktionsenzym MspJI fragmentiert wurde.

Es konnte bei allen Zellpopulationen unmethylierte Minicircle-DNA nachgewiesen werden, d.h. dass auch in den Zellen ohne messbare EGFP-Expression unmethylierte Minicircle-DNA vorliegt, die jedoch nicht exprimiert wird. Zur Überprüfung dieses Ergebnisses wurde dieselbe isolierte DNA mit dem Restriktionsenzym MboI behandelt und anschließend erneut eine partielle PCR durchgeführt. Dieses Restriktionsenzym besitzt über den Minicircle verteilt 12 Erkennungsstellen (s. Abbildung 54 (A)), ist jedoch nicht in der Lage methylierte DNA zu schneiden.



**Abbildung 55: Überprüfung der Methylierung der Minicircle-DNA in CHO-K1-Zellen durch Restriktion mit dem Enzym MboI und partieller PCR**

1 µg der isolierten Gesamt-DNA der Zellpopulationen wurde zunächst mit 5 U MboI für 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die enzymatische Reaktion abgestoppt und die DNA aufgereinigt. Die partielle PCR wurde jeweils mit 100 ng Gesamt-DNA durchgeführt. Die entstehenden PCR-Amplifikate wurden anschließend auf einem Agarosegel (1 % (w/v) Agarose) gelelektrophoretisch aufgetrennt. (A) PCR zur Amplifikation der Region 2 (1542 bp, Primer EPIGFPM18LC/HCfw und SV40GFP2\_rev). (B) PCR zur Amplifikation der Region 1 (846 bp, Primer EPIGFPM18LC/HCreV und SV40GFP2\_fw). M = 1 kbp DNA-Leiter (lineare DNA). „16+“, „33+“ = Mit MboI behandelte Gesamt-DNA aus der jeweiligen Zellpopulation. MC = Minicircle SV40GFPS/MAR, für die PCR wurde 1 µg DNA eingesetzt. H<sub>2</sub>O = Wasserkontrolle ohne DNA. MT/MboI = 1 µg Minicircle SV40GFPS/MAR wurde für 2 h mit 1 U CpG-Methyltransferase behandelt, aufgereinigt und anschließend in einer Restriktionsreaktion mit dem Enzym MboI (1 U) für 3 h inkubiert. Anschließend wurde die DNA aufgereinigt und eine partielle PCR mit 1 µg DNA durchgeführt. Es ist in diesem

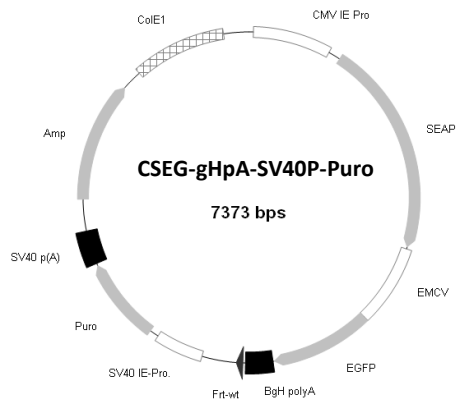
Fall ein Amplifikat entstanden, da die methylierte Minicircle-DNA durch das Restriktionsenzym MboI nicht geschnitten werden kann.

Nach der MboI-Behandlung ist bei der PCR auf die Region 2, die einen Teil des EGFP-Gens, das gesamte SAR M18 und die Polyadenylierungsstelle umfasst, bei jeder Zellpopulation ein Amplifikat entstanden. Die Region 1 konnte dagegen nur bei der Zellpopulation „33+“ und „33-“ amplifiziert werden. Durch die PCR in Abbildung 54 und Abbildung 55 wird also deutlich, dass in allen Zellpopulationen Minicircles mit und ohne Methylierungen in der Region 2 vorliegen. Die Region 1 ist, außer in den Zellpopulationen „33+“ und „33-“, unmethyliert. Diese Region umfasst die SV40-Promotor-Region und das zur Aufreinigung des Minicircles erforderliche Backbone mit der Lac-Operator-Sequenz.

### **3.3.3. Mögliche Inhibierung der DNA-Integration**

Da der überwiegende Teil der CHO-K1-Einzelklone neben episomalen Minicircles zusätzlich integrierte Minicircles aufwies, sollte eine Methode entwickelt werden, um die illegitime Integration der Minicircles zu verhindern. Die Integration findet wahrscheinlich über die nicht-homologe Rekombination („*non-homologous end-joining*“, NHEJ) statt. Dazu sind sowohl in der genomischen als auch in der Minicircle-DNA Strangbrüche nötig, die dann durch NHEJ repariert werden. Am NHEJ sind u.a. die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PKcs) und die DNA-Reparatur-Ligase IV beteiligt (Abbildung 7). Deshalb wurden unterschiedliche Agentien verwendet, die diese Moleküle inhibieren. Weiterhin wurden Agenzien verwendet, die Moleküle des alternativen NHEJ (aNHEJ), wie PARP-1 und die Ligase III, inhibieren. Zusätzlich sollten noch die Moleküle ATM/ATR inhibiert werden, die an der Doppelstrangbruch-Erkennung beteiligt sind und als Startpunkt einer Signalkaskade zur zellulären Antwort auf einen Doppelstrangbruch gelten.

Es wurden CHO-K1-Suspensionszellen mit den unterschiedlichen Agenzien vor der Transfektion entweder für 1 h oder 24 h vorbehandelt und nach der Transfektion über einen Zeitraum von 4 Tagen mit den Agenzien inkubiert. Für die Transfektion von CHO-K1-Suspensionszellen wurde der linearisierte Vektor CSEG-gHpA-SV40P-Puro verwendet, der neben einer EGFP-Expressionskassette zusätzlich eine Puromycin-Resistenzkassette enthielt. Durch die Messung der EGFP-Expression der transfizierten Zellen wurde die erfolgreiche Transfektion überprüft. 4 dpt wurden die unterschiedlichen Agenzien entfernt und 6 dpt wurde die Selektion der exprimierenden Zellen mit Puromycin begonnen. Durch die Inhibition der Reparaturwege mit den Agenzien in unterschiedlichen Kombinationen wurde erwartet, dass weniger Integrationen des linearisierten Vektors stattfinden.



**Abbildung 56: Vektorkarte des Vektors CSEG-gHpA-SV40P-Puro zur Überprüfung des Einflusses von Agenzien auf die Integration in die genomische DNA von CHO-K1-Suspensionszellen**

Der Vektor besteht aus einer SEAP/EGFP-Expressionskassette, einer Puromycin-Resistenzkassette und dem prokaryotischen „backbone“ mit einem Ampicillin-Resistenzgen („Amp“) und einem prokaryotischen Replikationsursprung („ColE1“). Der Vektor wurde mit dem Restriktionsenzym AhdI, welches strangaufwärts (5′) vom ColE1 eine Erkennungsstelle besitzt, linearisiert. Anschließend wurde je 1 µg linearisierte DNA in  $1 \times 10^6$  Zellen transfiziert. CMV IE Pro = „CMV immediate early promotor“. SEAP = „secreted alkaline phosphatase“-Gen. EMCV = EMCV-IRES-Element, Ribosomenbindungsstelle. EGFP = „enhanced GFP“-Gen. BgH polyA = Polyadenylierungsstelle. SV40 IE-Pro. = „SV40 immediate early promotor“. Puro = Puromycin-Resistenzgen. SV40 p(A) = Polyadenylierungsstelle. Amp = „Ampicillin-Resistenzgen für die Selektion in Prokaryoten. ColE1 = prokaryotischer Replikationsursprung.

Es wurden die in Tabelle 18 dargestellten Agenzien zur Inhibierung der illegitimen Integration in den angegebenen Konzentrationen verwendet. NU7026 inhibiert die Bindung der katalytischen DNA-Proteinkinase-Untereinheit (DNA-PKcs) an den KU70/KU80-Komplex. 3′-AB (3′-Aminobenzamid) inhibiert die Doppelstrangbruchererkennung durch die Poly(ADP-Ribose)Polymerase 1 (PARP-1). Cadmiumchlorid inhibiert u.a. die Funktion der zellulären Ligasen III und IV und Koffein soll die Doppelstrangbruchererkennung durch die DNA-PKcs und den ATM/ATR-Komplex verhindern.

**Tabelle 18: Verwendete Agenzien zur Inhibierung der illegitimen Integration in CHO-K1-Suspensionszellen**

	<b>Inhibitor</b>	<b>Ziel</b>	<b>Konzentration</b>
<b>A</b>	NU7026	DNA-PKcs	10 $\mu\text{mol L}^{-1}$
<b>B</b>	3'-AB	PARP	10 $\text{mmol L}^{-1}$
<b>C</b>	Cadmiumchlorid	Ligasen	2 $\mu\text{mol L}^{-1}$
<b>D</b>	Koffein	DNA-PKcs + ATM/ATR	4 $\text{mmol L}^{-1}$

NU7026 inhibiert die katalytische DNA-Proteinkinase-Untereinheit (DNA-PKcs) im NHEJ. 3'-Aminobenzamid (3'-AB) blockiert die Poly(ADP-Ribose)Polymerase 1 im aNHEJ. Cadmiumchlorid inhibiert u.a. die Ligasefunktion der Ligasen III und IV und Koffein verhindert die Strangbruchererkennung durch die DNA-PKcs und ATM/ATR. Für die Inhibierung wurden die Zellen 24 h vor der Transfektion mit NU7026 und Koffein und 1h vor der Transfektion mit 3'-AB und Cadmiumchlorid inkubiert. NU7026, 3'-AB und Koffein mussten alle 24 h erneut zu den Zellen hinzugefügt werden. Die eingesetzten Konzentrationen entsprechen den in der Literatur verwendeten Konzentrationen.

Durch die verwendeten Agenzien bestand also die Möglichkeit zur Hemmung des NHEJ, alternative NHEJ und der Doppelstrangbruchererkennung durch ATM/ATR. Die Agenzien wurden teilweise miteinander kombiniert eingesetzt, um eine erhöhte Effizienz der Inhibition zu erreichen. In Tabelle 19 sind die verwendeten Kombinationen mit den inhibierten Reparaturmechanismen dargestellt.

Die Transfektionseffizienz lag zwischen 50 und 55 %. Die Zugabe der jeweiligen Agenzien erfolgte alle 24 h bis zum Tag 4 pt. 6 dpt erfolgte die Selektion der Zellen in Selektionsmedium (10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Puromycin). Alle 3-4 Tage erfolgte die Subkultivierung bzw. ein Mediumwechsel mit frischem Selektionsmedium. Eine Puromycin-Resistenz kann nur durch die Integration des linearisierten Vektors und dessen Expression hervorgerufen werden. Durch Messung des Anteils der viablen Zellen an der gesamten Zellpopulation über die Zeit von 20 Tagen konnte untersucht werden, durch welche Agenzien-Kombination am wenigsten Zellen den Vektor funktionell integriert haben und deshalb eine Puromycin-Resistenz entwickelt haben. Die Zellen, die mit Cadmiumchlorid (allein und in Kombination mit anderen Agenzien) inkubiert wurden, sind 3 dpt komplett abgestorben (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass Cadmiumchlorid in der eingesetzten Konzentration offensichtlich toxisch für CHO-K1-Zellen ist. Die weiteren Ansätze ohne Cadmiumchlorid konnten jedoch untersucht werden und sind in Abbildung 57 als Wachstumskurve dargestellt.

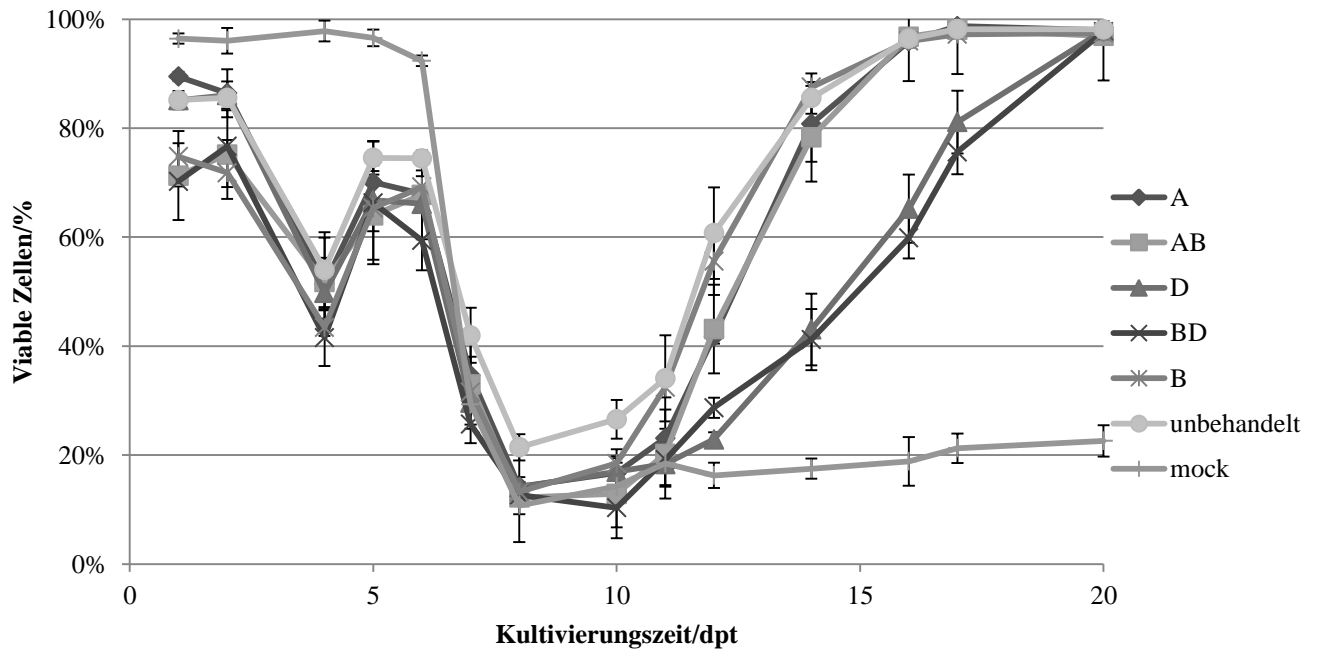


**Tabelle 19: Kombination der verwendeten Agenzien zur Inhibierung der illegitimen Integration**

Kombination	Ziel	Inhibierter DNA-Reparaturmechanismus
<b>A</b>	DNA-PKcs	NHEJ
<b>AB</b>	DNA-PKcs + PARP	NHEJ + aNHEJ
<b>AC</b>	DNA-PKcs + Ligase	NHEJ + aNHEJ
<b>ABC</b>	DNA-PKcs + PARP + Ligase	NHEJ + aNHEJ
<b>B</b>	PARP	aNHEJ
<b>BC</b>	PARP + Ligase	NHEJ + aNHEJ
<b>BD</b>	PARP + DNA-PKcs + ATM/ATR	NHEJ + aNHEJ + DSB-Signalkaskade
<b>BCD</b>	PARP + Ligase + DNA-PKcs + ATM/ATR	NHEJ + aNHEJ + DSB-Signalkaskade
<b>C</b>	Ligase	NHEJ + aNHEJ
<b>CD</b>	Ligase + DNA-PKcs + ATM/ATR	NHEJ + aNHEJ + DSB-Signalkaskade
<b>D</b>	DNA-PKcs + ATM/ATR	NHEJ + DSB-Signalkaskade

A: NU7026 (10 µM). B: 3'-Aminobenzamid (10 mM). C: Cadmiumchlorid (2 µM). D: Koffein (4 mM). DNA-PKcs: katalytische Untereinheit der DNA-Proteinkinase. PARP: Poly(ADP-Ribose)Polymerase-1. Ligase: Ligase III und IV. ATM/ATR: Polypeptid zur Doppelstrangbrückerkennung und Startpunkt einer Signalkaskade zur DNA-Reparatur.

Im Gegensatz zu den nicht-transfizierten Zellen sinkt die Viabilität der transfizierten Zellen bis zum Tag 4 pt auf 42-56 % (Abbildung 57). Da ebenfalls die Viabilität der unbehandelten, transfizierten Zellen sinkt, ist die Abnahme der Viabilität also wahrscheinlich auf die Transfektion bzw. auf die Transgen-Expression zurückzuführen. Während der Kultivierung der Zellen im Selektionsmedium sinkt erwartungsgemäß der Anteil der viablen Zellen, jedoch sinkt der Anteil bei den unbehandelten Zellen nur auf 22 %, wohingegen bei den behandelten Zellen ein Anteil von 10-15 % zu beobachten war. Die nicht-transfizierten Zellen („mock“) behalten über den gesamten Selektionszeitraum eine sehr niedrige Viabilität, da diese keine Resistenz durch den Vektor erhalten haben. Bei den restlichen Zellpopulationen steigt der Anteil der viablen Zellen über die Zeit. Bei den Zellen, die mit Koffein behandelt wurden (D und BD), steigt der Anteil der viablen Zellen langsamer, als bei den anderen Zellen.



**Abbildung 57: Wachstumskurve der unterschiedlich behandelten CHO-K1-Zellen nach der Transfektion mit dem Vektor CSEG-gHpA-SV40P-Puro**

Es wurden CHO-K1-Suspensionszellen (je 3 Ansätze) gemäß Tabelle 19 mit unterschiedlichen Agenzien behandelt und mit dem Vektor CSEG-gHpA-SV40P-Puro mithilfe von 25 kDa PEI (linear) transfiziert. Die Ansätze mit Cadmium (C) sind hier nicht dargestellt, da diese 3 dpt bzw. seit Beginn der Cadmiumbehandlung vollständig abgestorben waren. Die Transfektion erfolgte mit PEI (25 kDa, linear) in einem Verhältnis PEI:DNA von 3:1. Die Viabilität der Zellen lag zum Zeitpunkt der Transfektion bei > 95 %. Bis Tag 4 dpt wurden alle 24 h die Agenzien hinzugefügt. 6 dpt wurden die Zellen in Selektionsmedium ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  Puromycin) kultiviert. Alle 3-4 Tage erfolgte eine Subkultivierung bzw. ein Mediumwechsel mit frischem Selektionsmedium. A: NU7026 ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). B: 3'-Aminobenzamid ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ). D: Koffein ( $4 \text{ mmol L}^{-1}$ ).

### 3.3.4. Etablierung von Minicircles in CAP-Zellen

In den bisherigen Untersuchungen wurden jeweils CHO-K1-Zellen verwendet. In diesen Zellen kam es regelmäßig zur Integration der Minicircle-DNA. Es sollte nun untersucht werden, ob die regelmäßige Integration des Minicircles in das CHO-K1-Genom spezifisch für diesen Zelltyp ist, da bereits festgestellt wurde, dass CHO-K1-Zellen zur bevorzugten Integration von zirkulärer DNA neigen.<sup>[214]</sup> Die Etablierung des Minicircles wurde deshalb in einer neuen Zelllinie, der CAP-Zelllinie, untersucht. CAP-Zellen sind von primären, humanen Amniozyten abgeleitet und sollen für eine hohe und stabile Expression von komplexen Proteinen geeignet sein. Weiterhin sollten unterschiedliche Transfektionsmethoden untersucht werden. Zum Vergleich der Etablierung der Minicircles in CHO-K1- und CAP-Zellen wurden diese jeweils durch Elektroporation und mithilfe von Polyethylenimin (25 kDa, linear; PEI) mit dem Minicircle SV40GFPS/MAR transfiziert. 1 und 12 dpt wurden die Zellpopulationen jeweils mittels FACS auf ihre EGFP-Expression sortiert. 19 dpt wurde die Gesamt-DNA der

Zellen aufgereinigt und durch Southern-Blot-Analyse der episomale Status der Minicircles untersucht. In Tabelle 20 ist der Anteil an EGFP-exprimierenden Zellen und viablen Zellen nach der Transfektion dargestellt.

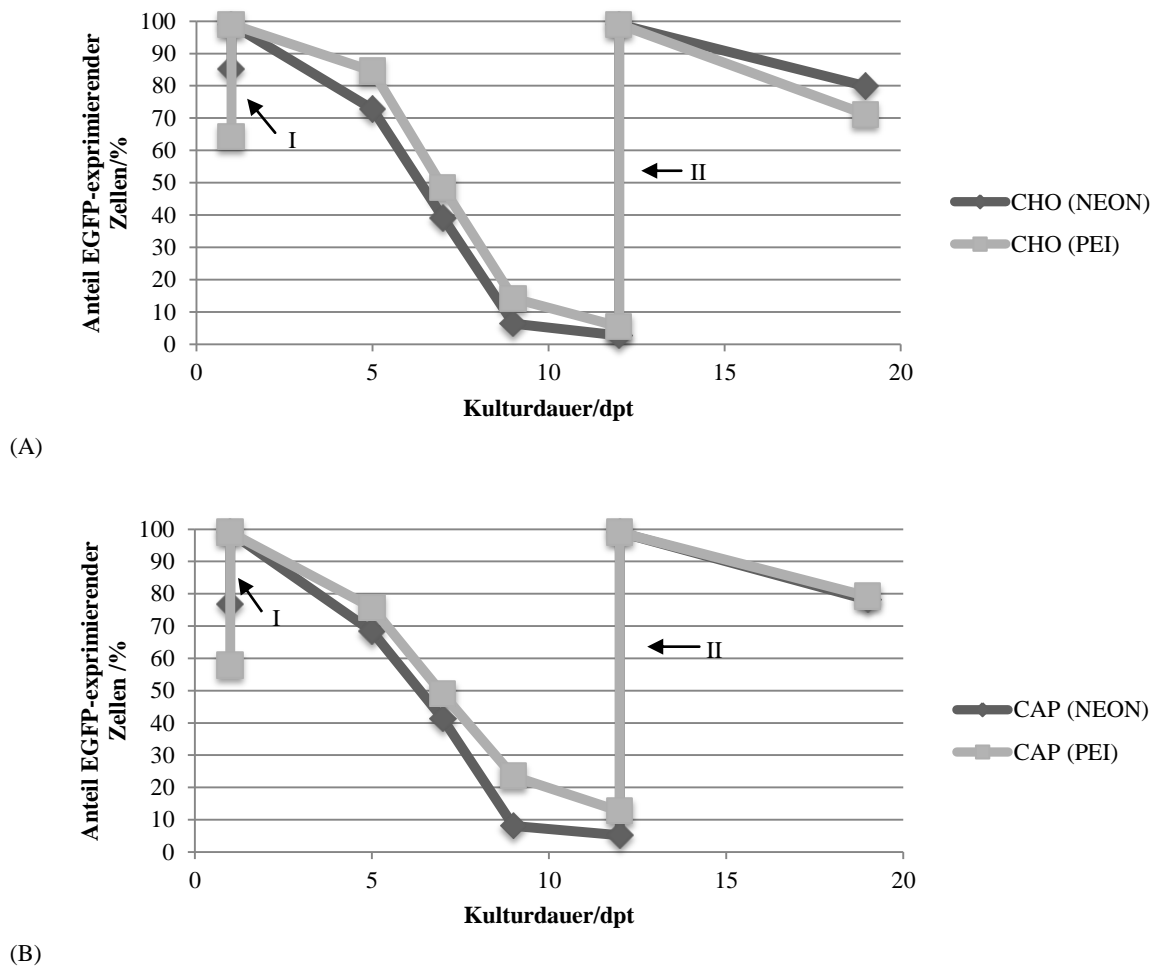
**Tabelle 20: Anteil an EGFP-exprimierenden Zellen und viablen Zellen nach der Transfektion mit dem Minicircle SV40GFPS/MAR**

	Elektroporation		PEI	
	EGFP-expr. Zellen [%]	Viable Zellen [%]	EGFP-expr. Zellen [%]	Viable Zellen [%]
<b>CHO-K1</b>	85,14 ± 2,51	68,37 ± 4,02	64,24 ± 3,04	94,73 ± 0,59
<b>CAP</b>	76,74 ± 1,43	73,67 ± 3,07	57,78 ± 2,24	98,60 ± 0,72

Es wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen mit 1 µg SV40GFPS/MAR transfiziert. Die Transfektion erfolgte entweder durch Elektroporation mit dem „NEON“-System von INVITROGEN oder mithilfe von PEI (25 kDa, linear) in einem Verhältnis PEI:DNA von 3:1. Die Messung der EGFP-exprimierenden Zellen und viablen Zellen erfolgte 1 dpt durch FACS. Die mittlere EGFP-Expression stellt den Mittelwert der gemessenen EGFP-Fluoreszenz der viablen, detektierten Zellen dar.

Erwartungsgemäß ist die Transfektionseffizienz, d.h. der Anteil an EGFP-exprimierenden Zellen, bei der Elektroporation höher als mit PEI. Jedoch ist der Anteil an viablen Zellen durch die Elektroporation auf 68-73 % gesunken. Dies hängt mit den Bedingungen der Elektroporation zusammen, die u.a. zu Strangbrüchen und zum Zelltod führen. Die Transfektion mit PEI zeigt zwar eine geringere Transfektionseffizienz, jedoch deutet der Anteil der viablen Zellen auf einen für die Zelle besser verträglichen DNA-Transfer hin. Die CAP-Zellen zeigen bei beiden Transfektionsmethoden einen etwas geringeren Anteil an EGFP-exprimierenden Zellen. Die Zellen wurden jeweils 1 und 12 dpt auf ihre EGFP-Expression durch FACS sortiert. Die EGFP-Expression wurde über die Zeit gemessen (Abbildung 58).

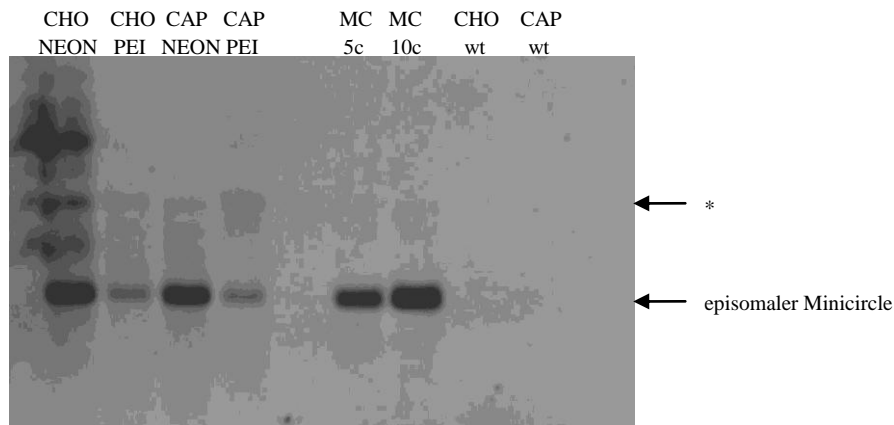
Die CHO-K1- und die CAP-Zellpopulationen zeigen annähernd denselben Verlauf des Anteils an EGFP-exprimierenden Zellen über die Zeit. Es ist ebenfalls zu erkennen, dass es bei beiden Zelllinien nach der 2. Sortierung auf EGFP zu einem Abfall des Anteils der EGFP-exprimierenden Zellen kommt.



**Abbildung 58: Anteil an EGFP-exprimierenden Zellen in (A) CHO-K1- und (B) CAP-Zellpopulationen nach der Transfektion mit dem Minicircle SV40GFPS/MAR**

Dargestellt ist der Anteil an EGFP-exprimierenden Zellen über die Zeit. Es wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen mit  $1 \mu\text{g}$  SV40GFPS/MAR transfiziert. Die Transfektion erfolgte entweder durch Elektroporation („NEON“) mit dem „NEON“-System von INVITROGEN oder mithilfe von PEI (25 kDa, linear) in einem Verhältnis PEI:DNA von 3:1. 1 dpt (I) und 12 dpt (II) wurden die EGFP-exprimierenden Zellen durch FACS selektiert und weiterkultiviert. 19 dpt wurde die Kultivierung gestoppt und die Gesamt-DNA aus den Zellen für eine Southern Blot-Analyse isoliert. (A) Anteil der eGFP-exprimierenden CHO-K1-Zellpopulationen, (B) Anteil der EGFP-exprimierenden CAP-Zellpopulationen. I = 1. Sortierung durch FACS. II = 2. Sortierung durch FACS.

Um zu untersuchen, in welcher Form (Episom oder Integrat) der Minicircle in den einzelnen Zellpopulationen vorliegt, wurde 19 dpt die Gesamt-DNA aus den Zellen isoliert und mittels Southern Blot-Analyse untersucht (Abbildung 59).



**Abbildung 59: Southern Blot Analyse mit der Gesamt-DNA aus CAP- und CHO-K1-Zellpopulationen, die mit dem Minicircle SV40GFPS/MAR transfiziert wurden**

Der Southern Blot wurde mit dem „AlkPhos Direct Labelling and Detection System mit CDP-Star“ von GE Healthcare durchgeführt. 10 µg der Gesamt-DNA des jeweiligen CHO-K1-Zellklons bzw. CHO-K1-Wildtyps wurde mit dem Restriktionsenzym XmnI geschnitten. Der Minicircle wurde dadurch linearisiert und die genomische DNA fragmentiert. Für die Hybridisierung wurde eine EGFP-S/MAR-Sonde verwendet. Es wurde zur Bestimmung des Minicircles eine Kontrolle, bestehend aus CHO-Wildtyp-DNA und SV40GFPS/MAR mitgeführt. „CHO NEON“ = DNA aus CHO-K1-Zellen, die durch Elektroporation transfiziert wurden. „CHO PEI“ = DNA aus CHO-K1-Zellen, die mithilfe von Polyethylenimin transfiziert wurden. „CAP NEON“ = DNA aus CAP-Zellen, die durch Elektroporation transfiziert wurden. „CAP PEI“ = DNA aus CAP-Zellen, die mithilfe von Polyethylenimin transfiziert wurden. „MC 5c“ = DNA aus CHO-K1-Wildtyp-Zellen mit 5 Kopien Minicircle-DNA pro Zelle. „MC 10c“ = DNA aus CHO-K1-Wildtyp-Zellen mit 10 Kopien Minicircle-DNA pro Zelle. „CHO wt“ = DNA aus CHO-K1-Wildtyp-Zellen. „CAP wt“ = DNA aus CAP-Wildtyp-Zellen. \* = Spezifisches Signal, dass durch den Minicircle hervorgerufen wird, da dieses Signal auch in den Positivkontrollen (MC 5c - MC 10c) vorkommt.

Alle untersuchten Zellpopulationen enthalten episomale Minicircle-DNA. Zusätzlich ist bei allen Zellpopulationen eine zusätzliche Bande zu erkennen (\*). „CHO PEI“ und „CAP NEON“ zeigen zwei weitere Banden. Die DNA der durch Elektroporation transfizierten CHO-K1-Zellpopulation („CHO NEON“) zeigt am meisten Banden.

### 3.3.5. Sequenzanalyse des SAR E und SAR M18

Da die Integration der verwendeten Minicircle-DNA in das CHO-K1-Genom ein oft beobachtetes Ereignis ist, sollte überprüft werden, ob das verwendete S/MAR-Element SAR M18 Sequenzhomologien mit der genomischen DNA von CHO-Zellen aufweist. Dadurch wäre die Wahrscheinlichkeit für eine Integration der Minicircle-DNA durch homologe Rekombination erhöht. Weiterhin wurde das S/MAR-Element SAR E auf Homologien mit den genannten Zellen überprüft. Da das SAR M18 vollständig im SAR E enthalten ist, liefert die Analyse des SAR E gleichzeitig die Daten für das SAR M18. Die Analyse wurde an der Universität Bielefeld (CeBiTec, Institut für Genomforschung und Systembiologie)

durchgeführt. Für den Sequenzabgleich wurden genomische Contigs der CHO-K1-Zellen der Universität Bielefeld und des Beijing Genomics Institute (BGI) verwendet.

GATCTAAATAAACTTATAAAATTGTGAGAGAAATTAATGAATGTCTAAGTTAATGCAGAAA  
 CGGAGAGACATACTATATTCATGAACATAAAGACTTAATATTGTGAAGGTATACTTTCTT  
 TCCACATAAAATTTGTAGTCAATATGTTCAACCCAAAAAGCTGTTTGTAACTTGCCAAC  
 CTCATTCTAAATGTATATAGAAGCCCAAGACAATAACAAAAATATTCTTGTAGAACA  
 AAATGGGAAAGAATGTTCCACTAAATATCAAGATTTAGAGCAAAGCATGAGATGTGTGGG  
 GATAGACAGTGAGGCTGATAAATAGAGTAGAGCTCAGAAACAGACCCATTGATATATGT  
 AAGTGACCTATGAAAAAATATGGCATTTTACAATGGGAAAATGATGATCTTTTCTTTT  
 TTAGAAAAACAGGGAAATATATTTATATGTAAAAATAAAGGGAACCCATATGTCATAC  
 CATACACAAAAAAATTCAGTGAAATATAAGTCTAAATGGAGAAGGCAAACTTTAAA  
 TCTTTTAGAAAAATAATATAGAAGCATGCCATCATGACTTCAGTGATAGAAAAATTTCTT  
 ATGACTCAAAGTCCTAACCAAGAAAAAGATTGTTAATTAGATTGCATGAATATTAAGA  
 CTTATTTTAAATTAATAAACCATTAAGAAAAGTCAGGCCATAGAATGACAGAAAATAT  
 TTGCAACACCCAGTAAGAGAAATTGTAATATGCAGATTATAAAAAGAAGTCTTACAAAT  
 CAGTAAAAATAAACTAGACAAAAATTTGAACAGATGAAAGAGAACTCTAAATAATCA  
 TTACACATGAGAACTCAATCTCAGAAATCAGAGAACTATCATTGCATATACACTAAATT  
 AGAGAAATATTAAAAGGCTAAGTAACATCTGTGGCAATATTGATGGTATATAACCTTGAT  
 ATGATGTGATGAGAACAGTACTTTACCCCATGGGCTTCTCTCCCAACCCCTTACCCAGT  
 ATAAATCATGACAAATATACTTTAAAAACCATTACCCTATATCTAACCAGTACTCCTCAA  
 AACTGTCAAGGTCATCAAAAAATAAGAAAAGTCTGAGGAAGTGTCAAACTAAGAGGAACC  
 CAAGGAGACATGAGAATTATATGTAATGTGGCATTCTGAATGAGATCCCAGAACAGAAAA  
 AGAACAGTAGCTAAAAAACTAATGAAATATAAATAAAGTTTGAACCTTTAGTTTTTTTAA  
 AAAAGAGTAGCATTAACACGGCAAAGCCATTTTCATATTTTCTTGAACATTAAGTACAA  
 GTCTATAATTAAAAATTTTTTAAATGTAGTCTGGAACATTGCCAGAAACAGAAGTACAGC  
 AGCTATCTGTGCTGTCGCTAATATCCATAGCTGATTGGTCTAAATGAGATACATCAA  
 CGCTCCTCCATGTTTTTGTCTTTCTTTTAAATGAAAACTTTATTTTAAAGAGGAGTT  
 TCAGGTTTCATAGCAAAATTGAGAGGAAGGTACATTCAAGCTGAGGAAGTTTCTCTATT  
 CCTAGTTTACTGAGAGATTGCATCATGAATGGGTGTTAAATTTGTCAAATGCTTTTTCT  
 GTGTCTATCAATATGACCATGTGATTTTCTTCTTTAACCTGTTGATGGGACAAATTACGT  
 TAATTGATTTTCAAACTGTAACCACTTACATATCTGGAATAAATTCTACTTGGTTGT  
 GGTGTATATTTTTGATACATTTCTTGGATTCTTTTGTCTAATATTTGTGAAAATGTTT  
 GTATCTTTGTTTCATGAGAGATATTGGTCTGTTGTTTTCTTTCTTGTAATGTCATTTTCT  
 AGTTCGGTATTAAGGTAATGCTGGCCTAGTTGAATGATTAGGAAGTATCCCTCTGCT  
 TCTGTCTTCTGAAAGAGATTGTAGAAAGTTGATACAATTTTTTTTCTTTAAATATTGA  
 TAGA

Teilsequenz 1

Teilsequenz 2

Teilsequenz 3

Teilsequenz 4

Teilsequenz 5

**Abbildung 60: Zusammenfassung der BLAST-Analyse der Suchsequenzen SAR E und SAR M18.**

Dargestellt ist die Sequenz des SAR E. Die Sequenz des SAR M18 ist grau hinterlegt. Homologe Bereiche zwischen dem SAR E/SAR M18 und den genomischen CHO-K1-Referenzen sind fett gedruckt und unterstrichen. Für diese BLASTn-Analyse wurde eine Sequenzidentität von  $\geq 80\%$  gewählt.

Der durchgeführte Sequenzvergleich zwischen der Sequenz des SAR E bzw. des SAR M18 und den genomischen CHO-K1-Referenzsequenzen erfolgte mit den bei der CHO-K1-Sequenzierung erhaltenen Contigs und ergab 5 Bereiche innerhalb des SAR E, die jeweils mehrfach in den Referenzgenomen Homologien aufwiesen (Tabelle 21). Die homologen Bereiche sind 38-82 Nukleotide lang.

**Tabelle 21: Anzahl der identifizierten homologen Bereiche zwischen der Suchsequenz SAR E und den genomischen Referenzen CHO-K1 von der Universität Bielefeld und CHO-K1 vom BGI.**

Teilsequenzen	Genomische Contigs Bielefeld	Genomische Contigs BGI
<b>1</b>	5 (4)	6 (5)
<b>2</b>	36 (36)	25 (25)
<b>3</b>	1 (1)	1 (1)
<b>4</b>	364 (17)	399 (5)
<b>5</b>	11 (0)	7 (0)

Länge des homologen Bereichs:  $\geq 25$  nt; Sequenzidentität:  $\geq 80$  % ( $\geq 90$  %). Contigs = Überlappende Teilstücke des CHO-K1-Genoms, welche zur kompletten Entschlüsselung des CHO-K1-Genoms verwendet wurden.

Teilsequenzen des SAR E kommen in unterschiedlicher Häufigkeit im CHO-K1-Genom vor. Die Teilsequenz 2 besitzt ausschließlich eine Sequenzhomologie mit dem CHO-K1-Genom von  $\geq 90$  %. Eine Sequenz von 20 Nukleotiden des SAR M18 weist ebenfalls eine Homologie mit dem CHO-K1-Genom auf, diese Homologie liegt jedoch nur bei 80-90 %. Das SAR E bzw. das SAR M18 besitzt keine vollständige Homologie mit den beiden CHO-K1-Genomen.

#### **4. Diskussion**

Die Generierung von therapeutischen Proteinen in Mammaliazellen ist ein komplexer Prozess, der die Berücksichtigung einer Vielzahl an unterschiedlichen Faktoren erfordert. Faktoren, die die Proteinproduktion beeinflussen sind z.B. transkriptionelle und translationelle Kontrollelemente, die posttranskriptionale RNA-Prozessierung, die Kopienzahl des Transgens, die mRNA-Stabilität, die chromosomale Region der Transgen-Integration, mögliche Toxizität des rekombinanten Proteins und die genetischen Eigenschaften der eukaryotischen Wirtszelle. Man unterscheidet zwischen der transienten und der stabilen Genexpression. Die transiente Genexpression wird normalerweise für die schnelle Produktion einer kleinen Menge an rekombinantem Protein zur initialen Charakterisierung, zur Untersuchung der Vektorfunktionalität und der Optimierung von unterschiedlichen Promotoren in Kombination mit anderen Elementen in Expressionsvektoren verwendet. Im Gegensatz zur transienten Genexpression hängt die stabile Genexpression davon ab, wo das Transgen bzw. der Expressionsvektor im Wirtsgenom integriert oder episomal etabliert werden kann.

Vorstudien gaben bereits Hinweise auf die Eignung eines Zwei-Minicircle-Systems als Grundlage eines flexiblen Systems zur Antikörperproduktion.<sup>[69]</sup> Bei der Verwendung von SAR M18-basierter Minicircle-DNA sollte die Etablierung der Minicircles ausschließlich episomal erfolgen und dadurch die illegitime Integration des Minicircles nahezu ausgeschlossen werden können. Die Generierung von stabil exprimierenden Zellen mit diesem System sollte dabei innerhalb von 15-25 Tagen möglich sein. Dies würde bedeuten, dass, gegenüber bisherigen Verfahren zur Generierung von stabil exprimierenden Zellen, ein schnellerer Zugang zu stabil exprimierenden Einzelzellklonen möglich wäre. Weiterhin würde die Vermeidung der Integration der Minicircle-DNA bedeuten, dass das Genom der transfizierten Zellen unbeeinträchtigt bleibt und somit keine Beeinträchtigung der Zellen durch Insertion innerhalb von essentiellen Genen entstehen könnte.

Auf Grundlage dieser Erkenntnisse sollte die Produktion von rekombinanten Proteintherapeutika mit SAR M18-Minicircle-DNA validiert und weiterentwickelt werden. Die in dieser Arbeit ermittelten Stabilitäts- und Expressionseigenschaften der episomal replizierenden Minicircles werden im Folgenden diskutiert und bewertet. Weiterhin werden unterschiedliche Ansätze zur Verbesserung des Minicircle-Systems vorgestellt.



#### **4.1. Das Zwei-Minicircle-System zur Produktion von rekombinanten Antikörpern**

##### **4.1.1. Die Produktion von IgG-Molekülen ist mit nur einem Screeningmarker möglich**

In Vorarbeiten wurde ein regulierbares Coexpressionssystem mit zwei parallel etablierten Minicircle-Vektoren zur Generierung von IgG-Molekülen entwickelt.<sup>[69]</sup> Bei diesem System enthielt ein Minicircle das IgG-LC-Gen in Kombination mit dem EGFP-Gen und ein weiterer Minicircle das IgG-HC-Gen in Kombination mit einem RFP-Gen. Damit konnten die Zellen mittels FACS sortiert werden, die beide Minicircles enthielten bzw. exprimierten. Bei diesem System wurde postuliert, dass die verwendeten Minicircles ausschließlich episomal im Kern etabliert werden können. Die Expressionskassette des fluoreszierenden Proteins diene einerseits als Reportergen („*gene of duty*“) und andererseits übernahm diese die für die Etablierung des Minicircles notwendige Transkription durch das S/MAR-Element. Das System vereint die Vorteile von transienten und permanenten Expressionssystemen. Die transiente Expressionsphase liefert das gewünschte Produkt sofort und in hoher Ausbeute. Die stabile Expression lässt sich nach einer Etablierungsphase, in der stabil exprimierende Klone selektiert werden, erreichen. Ein weiterer Vorteil des Minicircle-Systems sollte die schnelle Generierung von stabil exprimierenden Einzelzellklonen für die Expression von rekombinanten Proteintherapeutika innerhalb von 20-25 Tagen sein.

In den Vorstudien wurde festgestellt, dass die gleichzeitige Expression von EGFP, RFP, IgG-LC und IgG-HC das CHO-Zellwachstum behindert bzw. die Zelle überlastet. Deshalb sollte ein neues System, welches aufgrund einer Autoregulation nur noch mit einem Screeningmarker (EGFP) auskommt, untersucht werden. Die IgG-LC übernimmt bei der Faltung der IgG-HC im ER eine Chaperonfunktion. Wenn die IgG-HC allein exprimiert wird, sammelt sie sich im ER an, wodurch die gesamte Proteinfaltung und -prozessierung der Zelle im ER gestört wird. Dies führt zur Inhibition des Zellwachstums bzw. zum Zelltod.<sup>[202,215]</sup> Die IgG-LC kann allein von Mammaliazellen sekretiert werden.<sup>[216,217]</sup> Wenn also das IgG-HC-Gen und das EGFP-Gen zusammen auf einem Minicircle und das IgG-LC-Gen allein auf einem anderen Minicircle vorliegt, sollte es also nach der Transfektion der beiden Minicircles durch die Sortierung von proliferierenden EGFP-exprimierenden Zellen aufgrund der Autoregulation möglich sein, Zellen anzureichern, die funktionelle Antikörper produzieren. Die Zellen, die nur den EGFP/IgG-HC-Minicircle enthalten, sollten absterben. Zellen, die nur den IgG-LC-Minicircle enthalten, würden keine EGFP-Expression zeigen.

Wie erwartet, kann die IgG-LC allein sekretiert werden (Tabelle 1, Transfektion IV). Im Fall der Cotransfektion I lag das Markergen EGFP zusammen mit dem IgG-LC-Gen auf dem Minicircle „A“ und das IgG-HC-Gen allein auf dem Minicircle „B“ vor (Tabelle 1). Es konnte gezeigt werden, dass in diesem Fall keine Kopplung der EGFP-Expression an die IgG-Produktion vorliegt, da im Vergleich zur Cotransfektion II zwar eine höhere EGFP-Expression jedoch eine niedrigere IgG-Produktion vorliegt. Bei der Cotransfektion I ist es möglich, dass Zellen, die nur den Minicircle „A“ im Zellkern enthalten und damit nur die IgG-LC sekretieren, über ihre EGFP-Expression durch FACS angereichert werden. Die IgG-LC ist jedoch im durchgeführten ELISAssay nicht detektierbar. Nach der Cotransfektion I sind deshalb eine nicht-exprimierende (ohne Minicircles), eine schwach-exprimierende (mit beiden Minicircles) und eine stark-exprimierende Zellpopulation (nur mit dem Minicircle „A“) zu erkennen (Abbildung 15).

Bei der Cotransfektion II lag das Markergen EGFP zusammen mit dem IgG-HC-Gen auf dem Minicircle „C“ und das IgG-LC-Gen allein auf dem Minicircle „D“ vor. Die Zellen, bei denen eine EGFP-Expression und Proliferation zu beobachten ist, müssen also, wie durch die Transfektion III gezeigt, ebenfalls die IgG-LC exprimieren, da sie ansonsten, durch Akkumulation der IgG-HC im ER, das Zellwachstum einstellen bzw. absterben würden. Die Cotransfektion II weist nur eine nicht-exprimierende (ohne Minicircles) und eine schwach-exprimierende Zellpopulation (mit beiden Minicircles) auf. Bei der Cotransfektion II können im Vergleich zur Cotransfektion I keine stark-exprimierenden Zellen entstehen, da beide Minicircles zur Proliferation der Zellen benötigt werden und somit keine hohe Gendosis des EGFP-enthaltenden Minicircles „C“ möglich ist.

Aufgrund der besonderen Chaperonfunktion der IgG-LC ist es also möglich, ein Minicircle-Coexpressionssystem (Coexpressionssystem II) zur Generierung von IgG-Molekülen mit nur einem Screeningmarker (EGFP) zu nutzen, da das IgG-LC-Gen einerseits als „*gene of interest*“ (Teil des IgG-Moleküls) und andererseits als „*gene of duty*“ zum Überleben der Zelle dient.

#### **4.1.2. Steigerung der IgG-Produktion durch Verwendung des hUbC-Promotors**

Die durch die Coexpression II vermittelte durchschnittliche IgG-Produktivität der Zellpopulationen betrug anfangs 0,06 pcd in adhärennten CHO-K1-Zellen (Tabelle 2). Die Expression der beiden IgG-Ketten wurde in den verwendeten Minicircles des Coexpressionssystems II jeweils durch einen schwachen SV40 Promotor gesteuert.

Ein humaner Ubiquitin C (hUbC)-Promotor zeigte in unterschiedlichen Zelllinien, u.a. in CHO-Zellen, ein großes Potential in Bezug auf die Expressionshöhe und die Langzeitexpression eines Transgens.<sup>[218,219]</sup> Bei Verwendung des hUbC-Promotors in Kombination mit dem pEPI-Vektor und dem SAR E konnte eine erhöhte und verlängerte Transgenexpression in hämatopoetischen Zellen ohne Selektionsdruck beobachtet werden.<sup>[220]</sup> Dabei ergab die Untersuchung des episomalen Status der Vektoren zu verschiedenen Zeitpunkten das Vorhandensein extrachromosomaler DNA. Um die Expression zu steigern, fand deshalb in den verwendeten Minicircles ein Austausch des SV40-Promotors strangaufwärts der IgG-Gene gegen einen hUbC-Promotor statt (Tabelle 3, MH3). Der Screeningmarker EGFP blieb dabei unter der Kontrolle des SV40-Promotors, da nur die IgG-Produktion verglichen werden sollte und eventuelle Beeinträchtigungen der Zelle durch zu hohe EGFP-Mengen ausgeschlossen werden sollten.

Durch Vergleich der IgG-Expression der Cotransfektion MH1 (mit SV40-Promotor) mit MH3 (mit hUbC-Promotor) konnte gezeigt werden, dass die Verwendung des hUbC-Promotors in pEPI-Minicircles eine erhöhte Expression in adhärenenten CHO-K1-Zellen vermittelt. Die IgG-Produktivität konnte durch den Promotoraustausch auf 0,13 pcd gesteigert werden (Tabelle 4, 17 dpt). Eine Steigerung der transienten IgG-Produktion konnte ebenfalls in CHO-K1-Suspensionszellen nachgewiesen werden (Tabelle 13).

Die Verwendung des hUbC-Promotors vermittelt also im Vergleich zum SV40-Promotor eine höhere Transgenexpression in CHO-K1-Zellen und bietet somit eine verbesserte Alternative zu dem viralen SV40-Promotor zur Expression von rekombinanten Proteinen.

#### **4.1.3. Es besteht eine gewisse Korrelation zwischen der EGFP- und der IgG-Expression**

Zur definierten Bestimmung der IgG-Produktionsleistung wurden IgG-produzierende Einzelklone mittels FACS generiert. Die Einzelklone wurden gemäß ihrer EGFP-Expression mittels FACS in „hoch“-EGFP-exprimierende und „mittel“-EGFP-exprimierende Zellen geteilt. Dabei stellte sich heraus, dass durch die Selektion von „hoch“-EGFP-exprimierenden Zellklonen nicht gleichzeitig Zellklone mit einer hohen IgG-Produktivität selektiert wurden (Tabelle 7). Dies bedeutet, dass durch eine hohe EGFP-Expression nicht gleichzeitig auf eine hohe IgG-Produktion geschlossen werden kann. Dagegen zeigten die „mittel“-EGFP-exprimierenden Zellpopulation keine IgG-hochexprimierende Zellen (Tabelle 7). Durch die Anreicherung von „mittel“-EGFP-exprimierenden Zellen können somit keine Zellen mit

hoher IgG-Produktion erhalten werden. Um Zellklone mit hoher IgG-Produktion zu generieren, müssen also mittels FACS Zellklone mit einer hohen EGFP-Expression sortiert werden. Dies führt jedoch nicht zwangsläufig zu Zellklonen mit hoher IgG-Produktion. Um diese Aussage genauer zu überprüfen, wurde bei 18 Klonen mit unterschiedlichen IgG-Expressionswerten die Korrelation zwischen EGFP- und IgG-Expression untersucht. Eine eindeutige Korrelation zwischen der IgG-Produktion und der EGFP-Expression war mit dem verwendeten Zwei-Minicycle-System nicht erkennbar (Abbildung 21).

Für die geringe Korrelation kann es mehrere Gründe geben. Die Produktion von rekombinanten Proteinen ist ein komplexer Prozess, der mehrere Schritte, wie die Transkription, die posttranskriptionale Prozessierung der mRNA, die Translation, die postrtranslationale Prozessierung des Proteins und eventuell auch die Sekretion des Proteins, beinhaltet.<sup>[221,222,223]</sup> Der Grad der Expression wird durch die Effizienz der einzelnen Schritte bestimmt, jedoch wird normalerweise davon ausgegangen, dass die Transkription den wichtigsten Schritt bei der Expression eines Proteins darstellt. Die fehlende Korrelation kann daher durch die unterschiedlichen Expressions- und Prozessierungsgeschwindigkeiten der Proteine entstehen, da die IgG-Gene unter der Kontrolle eines hUc-Promotors und das EGFP-Gen unter der Kontrolle eines SV40 Promotors stehen. Außerdem ist das IgG-Molekül ein sekretorisches Protein und das EGFP-Protein ein intrazelluläres Protein, sodass es möglicherweise bei der Detektion der zur gleichen Zeit exprimierten Proteine zu zeitlichen Verschiebungen kommen kann.

Der Hauptgrund für die geringe Korrelation zwischen der EGFP- und der IgG-Expression ist wahrscheinlich, dass das EGFP und die IgG-Gene jeweils als eigene vollständige Expressionskassette vorlagen. Kaufman et al.<sup>[224]</sup> zeigten eine fehlende Korrelation zwischen zwei Expressionskassetten auf dem Vektor pEGFP-C1. Der Vektor enthielt eine Expressionskassette mit einem EGFP-Gen und einem Neomycin-Resistenzgen. Der lineare Vektor wurde in HeLa-Zellen transfiziert. Anschließend wurde ein Teil der Population durch G418-Selektionsmedium kultiviert, um eine stabil exprimierende Zellpopulation zu generieren. Bei dem anderen Teil wurden durch zweimalige FACS-Sortierung auf EGFP stabil EGFP-exprimierende Zellen selektiert. Die beiden resultierenden stabil exprimierenden Populationen wurden anschließend auf ihre EGFP-Expression überprüft. Die durch G418 selektierte Zellpopulation zeigte nur einen geringen Anteil an EGFP-exprimierenden Zellen, die durch FACS-Sortierung generierte Zellpopulation zeigte dagegen einen hohen Anteil an EGFP-exprimierenden Zellen, jedoch nur eine geringe G418-Resistenz. Es konnte also auch

in diesem Fall keine Korrelation zwischen der EGFP-Expression und der G418-Resistenz beobachtet werden. Dies zeigt, dass bei der Verwendung von zwei getrennten Expressionskassetten bei der Betrachtung der Expression des einen Proteins nicht auf die Expressionshöhe des anderen Proteins geschlossen werden kann.

Als Alternative wurde von Kaufman et al. <sup>[224]</sup> ein Vektor transfiziert, der ein GFP-Gen (Cistron 1) und ein Oberflächenmarker-Gen (Cistron 2), die durch eine Ribosomenbindungsstelle („*internal ribosome entry site*“, IRES) verbunden waren, beinhaltete. Dadurch entstand nach der Transkription eine bicistronische mRNA. Durch zweimalige magnetische Zellseparation („*magnetic cell separation*“, MACS) und anschließender Einzelzellklonierung durch „*limiting dilution*“ wurden Einzelklone mit einer stabilen und einheitlichen GFP-Expression erhalten. Die erfolgreiche Korrelation zwischen dem Screeningmarker (z.B. EGFP) und dem „*gene of interest*“, verbunden durch ein IRES-Element, wurde ebenfalls in CHO-Zellen beschrieben. <sup>[225]</sup>

Eine weitere Methode zur Anreicherung von produzierenden rekombinanten CHO-Zellen ist die Nutzung von Antikörpern, welche mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt und gegen das rekombinante Protein gerichtet sind. <sup>[226]</sup> Bei dieser Methode wird davon ausgegangen, dass das sekretierte rekombinante Protein auch auf der Zelloberfläche detektierbar ist. Die Markierung der rekombinanten Proteine auf der Zelloberfläche erfolgt bei niedriger Temperatur mit einem monoklonalen IgG, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Durch die anschließende FACS-Sortierung auf die jeweilige Fluoreszenz können somit Zellen mit einer hohen IgG-Expression sortiert werden.

Mit dem verwendeten Zwei-Minicircle-System konnte wahrscheinlich aufgrund der getrennten Expressionskassetten auf einem Minicircle nur eine geringe Korrelation zwischen der EGFP- und der IgG-Expression festgestellt werden. Mögliche Lösungsansätze wären die Verwendung einer Ribosomenbindungsstelle zwischen dem „*gene of duty*“ und dem „*gene of interest*“ in Verbindung mit einem S/MAR-Element oder die direkte Selektion der Zellen aufgrund ihrer IgG-Expression.

## **4.2. Etablierung der Minicircles im Zellkern**

### **4.2.1. Minicircles werden episomal etabliert**

Die Episomalität der Minicircles wurde mittels Southern Blot-Analyse untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass im Fall des Zwei-Minicircle-Systems beide verwendeten

Minicircles in den untersuchten CHO-K1-Zellklonpopulationen teilweise stabil episomal vorlagen, d.h. dass entweder beide Minicircles oder nur einer von beiden Minicircles stabil episomal etabliert waren (Abbildung 24 und Abbildung 25). CHO-K1-Zellklonpopulationen mit dem Minicircle SV40GFPS/MAR zeigten bis zu 7 Monaten nach der Transfektion episomal vorliegende Minicircle-DNA im Zellkern (Abbildung 51 und Abbildung 52). Aufgrund der Tatsache, dass zur Etablierung und der episomalen Erhaltung der Minicircles eine aktive Transkription in bzw. durch das S/MAR-Element erforderlich ist, muss, neben der Expression durch integrierte Minicircles, eine gewisse Expression durch die episomalen Minicircles stattfinden. Damit kann davon ausgegangen werden, dass die SAR M18 enthaltende Expressionskassette nicht zerstört wurde und damit die Expression des jeweiligen Proteins (IgG-LC oder EGFP) durch den episomalen Minicircle vermittelt wird. Weiterhin konnte der Minicircle SV40GFPS/MAR in humanen Amniozyten (CAP-Zellen) episomal etabliert werden (Abbildung 59). Dies zeigt die Fähigkeit des SAR M18 zellunabhängig die episomale Etablierung von Minicircles zu vermitteln.

#### **4.2.2. Minicircles integrieren zusätzlich zur episomalen Etablierung in das Wirtsgenom**

Neben den episomal vorliegenden Minicircles wurden in allen untersuchten Zellklonen zusätzliche Integrationen in das Wirtsgenom gefunden (Abbildung 24, Abbildung 25, Abbildung 51 und Abbildung 52). Beim Vergleich der unterschiedlichen Bandenintensitäten der episomalen und integrierten DNA (Tabelle 10), die auf die Kopienzahl des episomalen oder integrierten Minicircles zurückzuführen sind, in der Southern-Blot-Analyse mit der EGFP- oder IgG-Produktivität, zeigte sich, dass die EGFP- bzw. IgG-Expression nicht mit der Minicircle-Kopienzahl in einem Verhältnis steht. Der Grund dafür sind wahrscheinlich die Integrationen des Minicircles an unterschiedlichen Loci der genomischen DNA.

Die Wahrscheinlichkeit für eine funktionelle Integration zirkulärer Vektoren ohne Selektionsmarker und -druck ist relativ gering. Linearisierte DNA wird mit einer Wahrscheinlichkeit von 1:10000 in das Wirtsgenom integriert<sup>[227]</sup>, bei zirkulärer DNA ist die Wahrscheinlichkeit sogar noch geringer. Die Integration der Minicircle-DNA muss somit durch eine ungewollte Linearisierung durch Strangbrüche hervorgerufen werden. Zu Strangbrüchen kann es vor der Transfektion bei der Gelaufreinigung der DNA nach der Generierung der Minicircles kommen, sodass die transfizierte DNA Kontaminationen mit linearisierter DNA aufweist. Dies zeigt die Wichtigkeit der richtigen Präparation an ccc-DNA bei der Verwendung von Minicircle-DNA. Nach der Transfektion können, wie bereits

erwähnt, zelluläre Nukleasen Strangbrüche hervorrufen. Weiterhin kann die FACSORTIERUNG der Zellen zur Generierung von Einzelklonen eine Ursache für die Integration bzw. für Strangbrüche, sowohl in der Minicircle-DNA als auch in der genomischen DNA, sein. Bei der FACSORTIERUNG sind die Zellen einem gewissen Stress durch elektrische Ladungen und suboptimaler Kulturführung ausgesetzt.

Sehr wichtig ist die verwendete Zelllinie, denn im Gegensatz zu anderen Zelllinien, neigen CHO-K1-Zellen bevorzugt zur Integration von zirkulärer DNA, d.h. dass es offensichtlich in diesen Zellen vermehrt zu Doppelstrangbrüchen (z.B. durch Nukleasen) kommen muss.<sup>[228]</sup> Eine weitere Eigenschaft dieser Zelllinie ist die vermehrte Integration von mehr als einer Kopie an einem Integrationsort bei einem Gentransfer durch Elektroporation.<sup>[229]</sup> Diese Eigenschaften sind für die herkömmliche Generierung von stabilen hochexprimierenden Zellklonen durch zufällige Integration in das Wirtsgenom von Vorteil. Für die Nutzung von episomal replizierenden Vektoren stellen diese Eigenschaften einen Nachteil dar, da die Integration dieser Vektoren in das Wirtsgenom vermieden werden soll. CHO-Zellen weisen überdies einen sehr instabilen Karyotypen auf. Durch Translokationen und homologer Rekombination kommt es ständig zur Neuordnung der Chromosomen, besonders als Antwort auf Amplifikationsprozesse.<sup>[230,231,232]</sup> Eine instabile Produktion bzw. ein Verlust des Transgens in CHO-Zellen wurde bei unterschiedlichen rekombinanten Proteinen, wie z.B. Antikörpermolekülen, beobachtet.<sup>[233,234]</sup> Teilweise wurde eine stabile Expression in CHO-Zellklonpopulationen mit integrierter Fremd-DNA erst nach 30-50 Tagen erreicht.<sup>[234,235]</sup> Die Gefahr der Integration der Minicircle-DNA in die genomische DNA der CHO-K1-Zellen ist somit höher als in anderen Zelllinien.

Wie bereits erwähnt, korreliert die jeweilige Kopienzahl bzw. Anzahl der Banden im Southern Blot nicht mit der jeweiligen IgG- oder EGFP-Expression der Zellen, d.h. z.B. die hohe Anzahl der Banden des Zellklons A1 (Abbildung 24 und Abbildung 25) im Southern Blot resultiert im Vergleich zu anderen Zellklonen nicht in einer hohen IgG-Expression. Für eine funktionelle Integration muss die jeweilige Expressionskassette bei der Integration erhalten bleiben. Dies ist bei den verwendeten Minicircles zur IgG-Produktion sehr unwahrscheinlich, da bei diesen keine nutzlosen Sequenzen („*spacer*“-DNA) enthalten sind, die Minicircles also nur aus zirkulären Expressionskassetten bestehen. Ein zufälliger Doppelstrangbruch muss also genau vor dem jeweiligen Promotor stattfinden. Ein weiterer Doppelstrangbruch ist auch im S/MAR-Element denkbar, da dieses bei einer Integration nicht mehr benötigt wird. Da es jedoch vor der illegitimen Integration zur Deletion von DNA-

Stücken durch Exonukleasen kommt, kann die Integration eines funktionellen Minicircles kein häufiges Ereignis sein. Die meisten integrierten Minicircles sind also wahrscheinlich inaktiv. Auch wenn nicht komplett ausgeschlossen werden kann, dass die Expression durch die integrierte Minicircle-DNA vermittelt wird, muss aufgrund der Tatsache, dass zur Etablierung und der episomalen Erhaltung der Minicircles eine aktive Transkription in bzw. durch das S/MAR-Element erforderlich ist, eine gewisse Expression durch die episomalen Minicircles stattfinden und damit die Expressionskassette nicht zerstört worden sein. Dies trifft besonders auf Minicircles mit nur einer Expressionskassette zu.

Bei dem in dieser Arbeit entwickelten Zwei-Minicircle-System besteht der Minicircle zur Expression der IgG-LC (Minicircle „J“) nur aus einer, das SAR M18 enthaltenden, Expressionskassette. Bei diesem Minicircle ist die Wahrscheinlichkeit einer funktionellen Integration geringer als bei dem Minicircle „I“, da nur im SAR M18 ein Doppelstrangbruch entstehen kann. Bei einem Doppelstrangbruch im SAR M18 kann es vorkommen, dass das IgG-LC-Gen trotzdem exprimiert wird, da es möglicherweise in 5'-Position von einem Polyadenylierungssignal integriert wird. Der Minicircle zur Expression des EGFP-Proteins und der IgG-HC (Minicircle „I“) besteht aus zwei getrennten Expressionskassetten. Es kann also vorkommen, dass die IgG-HC-Expressionskassette durch einen Strangbruch und anschließender illegitimer Integration zerstört wurde, die EGFP-Expressionskassette jedoch funktionell in das Genom integriert wurde. Dies ist wahrscheinlich bei den Zellklonpopulation C9 und F7 (Tabelle 10) der Fall, da in den Zellen nur der Minicircle „I“ vorliegt und dieser in das Wirtsgenom integriert wurde. Wenn in diesen Zellen eine IgG-HC-Expression stattfinden würde, würden die Zellen aus bereits erwähnten Gründen absterben. Daher kann also nur eine funktionelle EGFP-Expressionskassette vorliegen. Bei den Zellklonpopulationen D6 und A1 liegt der Minicircle „I“ ebenfalls nur als Integrat vor, der Minicircle „J“ liegt zusätzlich als Integrat vor. Es ist also eine EGFP- und eine IgG-Expression zu beobachten, d.h. dass beide Expressionskassetten funktionell in das Wirtsgenom integriert vorliegen. Wahrscheinlich existieren in diesen Zellpopulationen Integrate mit einer funktionellen IgG-Expressionskassette und einer nicht-funktionellen EGFP-Expressionskassette und umgekehrt, sodass IgG-Moleküle und das EGFP-Protein produziert werden können.

Bei dem entwickelten Zwei-Minicircle-System ist also bei der Anwesenheit von episomaler und integrierter Minicircle-DNA nicht klar definierbar, ob die Expression der EGFP- und der IgG-HC-Moleküle zusätzlich durch die integrierten Minicircles erfolgt. Dies legt nahe, dass bei Verwendung des Minicircles-Systems immer direkt auf das „*product of interest*“ gescreent



werden sollte (s. 4.1.3.) und die Verwendung von zwei Expressionskassetten auf einem Minicircle die Gefahr der unbemerkten funktionellen Integration von einer der Expressionskassetten erhöht und damit eine Korrelation der Expressionen nicht möglich ist.

Der kommerziell erhältliche Minicircle SV40GFPS/MAR enthält zusätzlich zur EGFP-Expressionskassette eine Lac-Operator-Sequenz, die für die Aufreinigung des Minicircles nötig ist. Durch einen Doppelstrangbruch in dieser Region könnte somit theoretisch auch eine funktionelle Integration des Minicircles in das Wirtsgenom stattfinden. Bei der Southern Blot-Analyse der DNA aus CHO-K1-Zellklonpopulationen (Abbildung 51) konnten tatsächlich EGFP-exprimierende Zellpopulationen mit ausschließlich integrierter Minicircle-DNA gefunden werden („31“ und „35“).

Bei der Bande direkt unterhalb der episomalen Minicircle-Bande (Abbildung 51) handelt es sich wahrscheinlich, um verkürzte episomale Minicircles, die aufgrund eines Doppelstrangbruchs im Laufe der Reparatur durch NHEJ verkürzt wurden. Es könnte sich jedoch bei dieser Bande ebenfalls um eine Integration in das Wirtsgenom handeln. Die kürzere Bande besitzt in den Zellklonpopulationen „16“, „19“, „21“, „33“, „34+“ und „34++“ (Abbildung 52) dieselbe Größe, sodass der Minicircle immer an derselben Stelle im Wirtsgenom integriert worden sein müsste. Dies würde darauf hin deuten, dass diese Zellpopulationen von einem Zellklon abstammen, der sich vor der 2. Sortierung (13 dpt) entwickelt hat.

Beim Vergleich mit den Minicircle-Positivkontrollen (mit dem episomalen Minicircle) zeigt sich anhand der Signalintensität, dass nicht jede Zelle der Zellpopulation episomale Minicircle-DNA enthalten kann, da die Kopienzahl höchstens bei 0,5 liegt (Abbildung 40). Dies spricht für einen Verlust des Minicircles über die Zeit.

Der für die Integration benötigte Strangbruch muss in diesem Fall in der Lac-Operator-Sequenz entstanden sein, da die EGFP-Expressionskassette offensichtlich intakt ist. Die Anzahl der Integrationen bzw. die Intensität der Banden korreliert ebenfalls nicht mit der EGFP-Expression, z.B. besitzt die Zellklonpopulation „24“ eine große Menge an episomaler Minicircle-DNA und eine zusätzliche Integration, trotzdem zeigt sie nur eine sehr geringe EGFP-Expression. Die episomale Minicircle-DNA scheint also in dieser Zellklonpopulation nur sehr schlecht exprimiert zu werden. Dagegen zeigt die Population „16“ eine hohe EGFP-Expression, obwohl die Minicircle-DNA-Menge offensichtlich geringer ist. Die

Expressionswerte scheinen also bei Nutzung dieses Minicircles stark von den unterschiedlichen Integrationen beeinflusst zu werden.

Die Verwendung von S/MAR-Minicircles, die ohne zusätzliche Sequenzen ausschließlich aus einer Expressionskassette bestehen, würde deshalb die Wahrscheinlichkeit einer Anreicherung von Zellen mit episomaler DNA erhöhen bzw. sicherstellen, dass die Expression ausnahmslos von der episomalen DNA vermittelt wird.

#### **4.2.3. Die durch Minicircles vermittelte Expression ist instabil**

19 Tage nach der Generierung von IgG-/EGFP-exprimierenden Zellklonen zeigten 57,5-77 % der untersuchten Zellklonpopulationen, keine EGFP- bzw. IgG-Expression (Tabelle 7). Dies zeigt, dass es auch in der als „stabil“ bezeichneten Expressionsphase zu Veränderungen des Expressionsverhaltens kommen kann. Bei den IgG-produzierenden Zellklonpopulationen ist die IgG-Produktivität über die Zeit gesunken (Tabelle 8). Von Tag 29 pt zum Tag 46 pt sinkt die IgG-Produktivität um 17(„B8“)–78(„A12“) %. Sehr deutlich ist dies an der Zellklonpopulation „B8“ zu erkennen. Die IgG-Produktivität lag 29 dpt bei 18,29 pcd (Tabelle 6), 46 dpt bei 15,20 pcd (Tabelle 8) und 77 dpt bei 6,22 pcd (Tabelle 9). Der Anteil der EGFP-exprimierenden Zellen verringerte sich ebenfalls in den untersuchten Zellklonpopulationen. Durch eine erneute FACSsortierung (60 dpt) sollte anhand der Zellklonpopulation „B8“ untersucht werden, ob durch eine späte Sortierung stabil exprimierende Zellklonpopulationen generiert werden können. Bereits 17 Tage nach der erneuten Sortierung zeigten die generierten EGFP-exprimierenden Zellpopulationen „B8 hoch“ und „B8 mittel“ erneut einen gewissen Anteil an nicht-EGFP-exprimierenden Zellen (Tabelle 9).

Um die Stabilität der durch Minicircles vermittelten Expression näher zu untersuchen, wurde die EGFP-Expression von 10 Zellklonpopulationen mit dem Minicircle SV40GFPS/MAR über einen Zeitraum von 150 Tagen verfolgt. Die Abnahme des Anteils der EGFP-exprimierenden Zellen über die Zeit erfolgte mit unterschiedlicher Geschwindigkeit (Abbildung 45 und Abbildung 46). Daran ist bereits zu erkennen, dass es bei der Etablierung der Minicircles Unterschiede geben muss. Durch eine 3. Sortierung durch FACS wurden die Einzelklonpopulation „24“ 65 dpt in eine EGFP-exprimierende und eine nicht-exprimierende Population geteilt. Die resultierende nicht-EGFP-exprimierende Zellpopulation „24-“ nahm die EGFP-Expression im Laufe der Zeit wieder auf (Abbildung 47). Dies würde für eine nicht-stabile Etablierung des Minicircles sprechen, d.h. dass sogar nach der

Einzelzellklonierung (16 dpt) noch keine endgültige Etablierung des Minicircles stattgefunden hat und es zu einer Neuordnung der Minicircles im Zellkern kommen kann und die Expression wieder aufgenommen werden kann. Die Einzelklonpopulation „34“ hat sich nach der Einzelzellklonierung (16 dpt) in eine schwach- und eine stark-exprimierende Population geteilt. Nach einer erneuten FACSortierung dieser beiden Zellpopulationen 65 dpt verringerte sich der Anteil der EGFP-exprimierenden Zellen über die Zeit bei beiden Populationen (Abbildung 48). In der sortierten stark-exprimierenden Zellpopulation „34++“ lagen nur stark-exprimierende und nicht-exprimierende Zellen vor. Bei einem „*gene silencing*“ würde sich eine schwach-exprimierende Population entwickeln, die später in eine nicht-exprimierende Population übergeht. Die Zellpopulationen „34++“ und „34+“ zeigen beide ein sog. an/aus-Signal. Dies deutet ebenfalls auf eine weitere Umsortierung oder Etablierung des Minicircles nach der Einzelzellklonierung (16 dpt) durch Rekombination in den CHO-K1-Zellen hin (s. 4.3.2.). Eine Veränderung der EGFP-Expression kann durch einen Verlust, eine epigenetische Inaktivierung der Minicircles (episomal oder integriert) oder durch nicht-funktionelle Integration des Minicircles in das Wirtsgenom der Zelle hervorgerufen werden. Durch eine Southern-Blot-Analyse der Zellpopulationen „34++“ und „34+“ konnte gezeigt werden, dass die Zellklonpopulation „34++“ im Vergleich zu „34+“ eine zusätzliche Minicircle-Integration enthielt. Dies deutet darauf hin, dass die höhere Expression der Zellpopulation „34“ durch den funktionell integrierten Minicircle vermittelt wird.

Durch die erneute Sortierung von vier Zellklonpopulation in exprimierende und nicht-exprimierende Zellen zu einem späten Zeitpunkt (155 dpt) konnte gezeigt werden, dass die durch Minicircles vermittelte Expression zu diesem späten Zeitpunkt stabil ist (Abbildung 49). Es fanden also offensichtlich keine epigenetischen Veränderungen, Integration in das Wirtsgenom oder Neuorganisation des Minicircles an der Kernmatrix statt (s. Begründung 4.3.2.).

Durch die in dieser Arbeit gewonnenen Daten wird also deutlich, dass die Etablierungsphase der SAR M18-enthaltenden Minicircles 16 dpt noch nicht abgeschlossen ist und damit die Generierung von Zellklonen durch zweimalige FACSortierung innerhalb von 10-16 dpt nicht möglich ist. Durch eine FACSortierung 155 dpt konnten jedoch stabil exprimierende Zellpopulationen generiert werden. Dabei kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass nur noch die integrierten Minicircles exprimiert werden. Dies zeigt, dass das verwendete Minicircle-System mit dem SAR M18 zurzeit nicht für die schnelle Generierung von hoch-

exprimierenden Zellklonen zur Produktion von rekombinanten Proteintherapeutika geeignet ist.

#### **4.3. Die durch SAR M18-Minicircles vermittelte Expression unterliegt epigenetischen Modifikationen**

##### **4.3.1. Die Histonacetylierung hat Auswirkungen auf die durch Minicircles vermittelte Expression**

Im Laufe der Kultivierung der Einzelzellpopulationen kommt es teilweise zum vollständigen Verlust der EGFP- und IgG-Expression. Um eine eventuelle epigenetische Inaktivierung der Minicircles zu untersuchen, wurden die IgG-produzierenden Zellklonpopulationen mit den Agenzien Natriumbutyrat und Valproat behandelt. Natriumbutyrat induziert u.a. über die nicht-kompetitive und reversible Hemmung der Histondeacetylase (HDACs) eine Histonacetylierung der Histone H3 und H4 und führt somit zur Auflockerung des Chromatins, zur Aktivierung von bestimmten Genen und zur Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase.<sup>[236]</sup> Valproat inhibiert die Histon-Deacetylase, sodass es zu einer Histon-Hyperacetylierung kommt.<sup>[237]</sup> Wie bei Untersuchungen des Vektors pEPI-EGFP<sup>[182,183]</sup> zeigte sich auch bei den hier verwendeten pEPI-Minicircles zur Generierung von IgG-Molekülen, dass die EGFP- und die IgG-Expression durch Natriumbutyrat und Valproat positiv beeinflusst werden kann (Tabelle 11 und Tabelle 12). Natriumbutyrat zeigte dabei einen stärkeren Einfluss auf die EGFP-Expression als auf die IgG-Expression, die durch den SV40-Promotor im Gegensatz zum hUbC bei der IgG-Expression kontrolliert wird (Abbildung 26, Histogramm). Der Grund dafür ist wahrscheinlich die Vielzahl der möglichen Modifikationen in der Zelle, die durch Natriumbutyrat hervorgerufen werden können.<sup>[Review:238]</sup> Valproat inhibiert dagegen ausschließlich die Histon-Deacetylase-Aktivität. Es liegt also auch bei der Verwendung von SAR M18 enthaltenden Minicircles eine Expressionsinhibierung vor, die durch Natriumbutyrat und Valproat aufgehoben werden kann.

Für die Etablierung des episomalen Minicircles ist eine aktive Transkription durch bzw. in das SAR M18-Element erforderlich. Der Transkriptionskomplex weist eine Histonacetylierungsfunktion auf.<sup>[239]</sup> Somit kann ein „gene silencing“ durch Histondeacetylierung theoretisch bei episomalen Minicircles nicht vorkommen, d.h. dass wahrscheinlich nur die Expression durch die integrierten Minicircles beeinflusst wurde.

Der Anteil der EGFP-exprimierenden Zellen änderte sich durch die Behandlung mit den Agenzien nicht. Zellen, die keine EGFP-Expression zeigten, konnten also durch eine

Natriumbutyrat- oder Valproat-Behandlung nicht zur Expression angeregt werden (Tabelle 12). Wahrscheinlich ist der episomale Minicircle im Laufe der Proliferation der Zellen verloren gegangen oder wurde nicht-funktionell in das Wirtsgenom integriert. Dies zeigt, dass es, wie bereits erwähnt, auch in der stabilen Expressionsphase eventuell zur Beeinträchtigung der Expression bzw. der Etablierung der Minicircles kommen kann. Es ist also keine schnelle Generierung von stabil exprimierenden Zellklonen mit episomalen SAR M18-Minicircles möglich.

#### **4.3.2. Minicircles können teilweise methyliert werden**

Um zu untersuchen, ob die durch SAR M18-Minicircles vermittelte Expression einer epigenetischen Inaktivierung aufgrund einer DNA-Methylierung unterliegt, wurden EGFP-/IgG-produzierende Zellen, deren Expression mit der Zeit gesunken ist, mit dem Agens 5'-Azacytidin (AzaC) behandelt (Tabelle 11 und Tabelle 12). AzaC bewirkt eine Demethylierung der genomischen DNA und damit eine Inhibierung des „*gene-silencing*“.<sup>[240]</sup> Die Behandlung der Zellklonpopulationen mit AzaC hatte nur einen geringen positiven (EGFP-Expression) bzw. sogar einen negativen Einfluss (IgG-Produktion) auf die Expression der untersuchten Proteine. Offensichtlich unterscheidet sich in diesem Fall der Einfluss von AzaC auf den SV40-Promotor (EGFP-Expression) und den hUbC-Promotor (IgG-Expression), was möglicherweise an einer unterschiedlichen Anzahl an Methylierungsstellen in bzw. vor dem jeweiligen Promotor liegen könnte.

In den mit dem Minicircle SV40GFPSMAR generierten Zellklonpopulationen hat sich jeweils eine nicht-exprimierende Zellpopulation gebildet, die 155 dpt von der exprimierenden Zellpopulation durch FACSsortierung getrennt wurde (Abbildung 49 und Abbildung 50). Durch Southern-Blot-Analyse und Full-length PCR konnte bestätigt werden, dass auch in nicht-exprimierenden CHO-K1-Zellen episomale Minicircles vorliegen (Abbildung 52 und Abbildung 53). Deshalb wurde untersucht, ob das „*gene-silencing*“ durch eine Methylierung der Minicircles hervorgerufen wurde. Durch die Restriktion der Gesamt-DNA der jeweiligen Zellklonpopulation mit methylierungsabhängigen Restriktionsenzymen mit anschließender partieller PCR wurde festgestellt, dass unabhängig von der EGFP-Expression in den untersuchten Zellklonpopulationen teilweise methylierte und nicht-methylierte Minicircles zusammen vorliegen (Abbildung 54 und Abbildung 55). Die Methylierung kommt überwiegend in der Region aus EGFP-Gen, S/MAR-Element und SV40-Polyadenylierungsstelle vor (Abbildung 54 (A)). Die Region um den Lac-Operator und den SV40-Promotor (Region 1) zeigte überwiegend keine Methylierung. Ob die Methylierung

dabei nur bei integrierten Minicircles bzw. episomalen Minicircles vorkommt, konnte nicht abschließend geklärt werden. Die Inaktivierung des Minicircles durch die Methylierung kann nicht der einzige Grund für eine Inaktivierung der Transkription sein, da auch nicht-exprimierende Zellen nicht-methylierte Minicircles aufweisen und umgekehrt. Dieses Phänomen wurde ebenfalls von K. Nehlsen beobachtet.<sup>[241]</sup> Bei Untersuchungen mit dem pEPI-Vektor wurde dabei gezeigt, dass es bei dem episomal replizierenden Vektor nach der Entfernung des Selektionsdrucks zu einer Verringerung des Anteils exprimierender Zellen innerhalb einer Zellklonpopulation kommt. Der episomale Status blieb dabei ohne Selektionsdruck erhalten. Der gleiche Effekt wurde bei der Verwendung eines episomalen Shuttle-Vektorsystems in humanen Fibroblastenzellen beobachtet.<sup>[242]</sup> Dort konnte eine Reaktivierung der Expression nach erneut beginnender Selektion erreicht werden.

Es wurde also gezeigt, dass die Minicircle-DNA nach der episomalen Etablierung als Episom, auch ohne aktive Transkription an der Kernmatrix gebunden, verbleiben kann. Der Rückgang der Expression ist daher wahrscheinlich nicht immer das Ergebnis eines Verlustes der Minicircles, sondern wird durch Inaktivierung bestimmter Minicircle-Sequenzen durch zelluläre Faktoren hervorgerufen.

Möglicherweise ist das „*gene silencing*“ der episomalen Minicircles ein Produkt der ständig ablaufenden Chromosomen-Neuanordnung durch Rekombination in CHO-K1-Zellen. Die Produktion von rekombinanten Proteinen in CHO-K1-Zellen zeigt oft den Verlust des Transgens durch eben diese Chromosomen-Neuanordnungen. In diesem Fall könnte ein episomaler Minicircle, der vorher in einer aufgelockerten DNA-Region (Euchromatin) gebunden wurde, in ein inaktives DNA-Umfeld gelangen. Dies würde bedeuten, dass obwohl das S/MAR-Element die DNA-Methylierung inhibieren kann, der Einfluss der Methylierung des umliegenden Heterochromatins auf die Methylierung des Minicircles größer ist, sodass es zur Inhibierung der Expression kommen könnte.

Es wird also deutlich, dass die Beeinflussung der Minicircles durch das umliegende Chromatin, neben dem bereits erwähnten Verlust der Minicircles in der stabilen Expressionsphase, eine weitere, aber nicht erwiesene, Erklärung für den Verlust der Expression sein könnte. Aufgrund der chromosomalen Instabilität der verwendeten CHO-K1-Zellen kann es somit zu einem „*gene silencing*“ der Minicircles durch Methylierung und Histonmodifikation kommen. Dies würde bedeuten, dass die gewünschte konstante, nicht zufallsbedingte, Transgenexpression mit SAR M18-Minicircles in CHO-K1-Zellen nicht möglich wäre.

#### **4.4. Ansätze zur Verbesserung der episomalen Etablierung der Minicircles und der Stabilität der Expression**

##### **4.4.1. Durch die Optimierung der Minicircle-Sequenz und durch Verwendung eines hUbC-Promotors kommt es zu einer höheren Expression**

Die 5'-untranslatierte Region des EGFP-Gens und des IgG-LC-Gens enthielten je zwei ATG-Codons. Die translationale Effizienz von eukaryotischen mRNAs hängt von den strukturellen Eigenschaften der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR, „*leader sequence*“) und den Nukleotidsequenzen um das Start-Codon ab.<sup>[243,244,245]</sup> Besonders die 5'-UTR-Länge, die Sekundärstruktur und die Anwesenheit von AUG-Codons strangaufwärts des tatsächlichen Start-Codons beeinflussen die Effizienz der Translation.<sup>[246,247,248]</sup> In den meisten Fällen senken zusätzliche AUG-Codons in der 5'-Region die Effizienz der Translation und werden deshalb als starkes negatives Signal zur Regulation der Translation betrachtet.<sup>[Review:249,250]</sup> Deshalb wurden die überflüssigen ATG-Codons entfernt und damit die 5'-untranslatierte Region des EGFP- und des IgG-LC-Gens verkürzt (Abbildung 17 und Tabelle 3).

Mit der Größe des pEPI-Vektors bzw. des pEPI-Minicircles sinkt die Stabilität des Vektors in der Zelle.<sup>[182]</sup> Die verwendeten Minicircles enthielten einen F1-Replikationsursprung (F1-ori), der für die Funktion der Minicircles in der Zelle nicht von Bedeutung ist. Deshalb wurde dieser Replikationsursprung deletiert, sodass die Klonierungskapazität der Vektoren gesteigert wurde. Außerdem kam es dadurch auch zur Verringerung bzw. Eliminierung von bakteriellen Sequenzen im verwendeten Minicircle, die zum „*gene silencing*“ führen könnten.

Der hUbC-Promotor zeigte in unterschiedlichen Zelllinien, u.a. in CHO-Zellen, ein großes Potential in Bezug auf die Langzeitexpression eines Transgens ohne „*gene silencing*“.<sup>[251,252]</sup> Weiterhin konnte bei Verwendung des hUbC-Promotors in Minicircle-DNA und Plasmid-DNA bei Hepatozyten eine stabilere Transgenexpression über mehrere Wochen im Vergleich zu dem Rous Sarkoma Virus-(RSV-) und dem Elongation Faktor 1 $\alpha$ -(EF1 $\alpha$ -) Promotor beobachtet werden.<sup>[253]</sup> Die Untersuchung der Histonmodifikationen zeigte dabei, dass diese bei den Plasmiden und Minicircles mit einem hUbC-Promotor denen des Euchromatins entsprechen, sodass die Wahrscheinlichkeit für ein „*gene silencing*“ gering ist. Bei Verwendung des hUbC-Promotors in Kombination mit dem pEPI-Vektor und dem SAR E konnte eine erhöhte und verlängerte Transgenexpression in hämatopoetischen Zellen ohne Selektionsdruck beobachtet werden, was ebenfalls auf die Inhibierung des „*gene silencing*“ hindeutet.<sup>[220]</sup> Die Untersuchung des episomalen Status der Vektoren ergab bei dieser

Untersuchung zu verschiedenen Zeitpunkten das Vorhandensein extrachromosomaler DNA. Durch den Austausch des SV40-Promotors strangaufwärts der IgG-Gene gegen einen hUbC-Promotor in Verbindung mit den erwähnten Sequenzoptimierungen des Minicircles sollte deshalb versucht werden, eine stabile und höhere Transgenexpression durch die Minicircles „I“ und „J“ (Tabelle 4, Cotransfektion MH4) zu erreichen.

Vor dem Austausch des SV40-Promotors gegen den hUbC-Promotor wurde jeweils ein SIDD-Profil vom jeweiligen Vektor erstellt. Es konnten keine negativen Einflüsse auf das Strangtrennungspotential des S/MAR-Elementes durch den hUbC-Promotor im SIDD-Profil detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Giannakopoulos *et al.* <sup>[254]</sup> integrierte, aufgrund der positiven Eigenschaften der S/MAR-Elemente auf die Transgenexpression und die episomale Erhaltung des jeweiligen Vektors, das SAR E in ein EBNA-1 Episom, um die positiven Eigenschaften auf diesen Vektor zu übertragen. Dadurch verlor jedoch der Vektor seine Fähigkeit zur episomalen Replikation. Als Grund dafür wurde eine Konkurrenz zwischen dem S/MAR-Element und dem destabilisierten EBV-Replikationsursprung angegeben. Diese konnte durch die Erstellung des SIDD-Profil des Vektors sichtbar gemacht werden. Die Notwendigkeit der Sequenzanalyse von S/MAR-basierten Vektoren mit Hilfe des SIDD-Profiles wird dadurch deutlich.

Beim Vergleich der Cotransfektionen MH3 und MH4 (Tabelle 4) ist zu erkennen, dass es, neben der bereits festgestellten IgG-Expressionssteigerung durch den hUbC-Promotor, zu einer Steigerung der IgG-Expression direkt nach der Transfektion (2 dpt) und in der stabilen Expressionsphase (17 dpt) durch die Optimierung der Minicircle-Sequenz gekommen ist (Abbildung 18). Die höhere IgG-Expression direkt nach der Transfektion kann durch einen besseren Transport der optimierten Minicircles in den Kern oder eine beschleunigte Erkennung durch Transkriptionsfaktoren entstehen. Nach der Transfektion der Minicircle-DNA und nach der ersten FACSsortierung nahm der Anteil an exprimierenden Zellen stark ab. Dies zeigt die mitotische Instabilität der Minicircles in einem großen Anteil der Zellen. Durch die Deletion des F1-Replikationsursprungs und der beiden 5'-ATGs konnte eine Steigerung um den Faktor 2-4 der IgG-Expression in den genannten Expressionsphasen beobachtet werden. Dies bedeutet, dass der F1-Replikationsursprung und die 5'-ATGs die Funktion der Minicircles oder die Transfektion beeinflussen.

Neben der höheren Expression und der Inhibierung des „gene silencing“ bietet der hUbC-Promotor ebenfalls die Möglichkeit die Etablierungsrate an episomaler DNA zu erhöhen. Da für die Etablierung des Minicircles über das S/MAR-Element eine aktive Transkription in das



S/MAR-Element nötig ist, könnte wahrscheinlich über eine höhere Transkriptionsrate eine bessere Etablierung erreicht werden. Neben den Promotoren gibt es ebenfalls die Möglichkeit unterschiedliche Elemente zur Steigerung der Expression und zur Unterdrückung von eventuellen Positionseffekten zu verwenden. Elemente, die verwendet werden können, sind z.B. Isolatoren, „*locus control elements*“ (LCR) und „*ubiquitous chromatin opening elements*“ (UCOE). Eine Funktion von Isolatoren ist die Verhinderung von Positionseffekten, deshalb flankieren diese oft rekombinante Gene auf den verwendeten Vektoren um eine stabile Proteinexpression zu gewährleisten.<sup>[255]</sup> LCRs haben ebenfalls die Fähigkeit Positionseffekte zu unterbinden bzw. zu reduzieren.<sup>[256,257]</sup> LCRs besitzen jedoch zusätzlich die Fähigkeit die Transgenexpression positionsunabhängig zu fördern. UCOEs sind DNA-Sequenzen, die mit ubiquitär exprimierten „*housekeeping*“-Genen assoziiert sind. Untersuchungen haben gezeigt, dass sie zelltyp-unabhängig verwendet werden und zu einer erhöhten Genexpression in transgenen Tieren führen können. Teilsequenzen dieser Elemente wurden in eukaryotische Expressionsvektoren verwendet, um eine stabile Transgenexpression durch die Blockierung des transkriptionalen „*silencing*“ zu erreichen.<sup>[258]</sup> Durch die Erhöhung der Transkriptionsrate könnte die Etablierung des episomalen Minicircles gefördert werden. Eine große Herausforderung stellt jedoch weiterhin die Verhinderung der Integration des Minicircles dar.

#### **4.4.2. Möglichkeit zur Inhibierung der Doppelstrangreparatur**

Die zufällige Integration von Minicircles in das zelluläre Genom der CHO-K1-Zelle stellt eine ernsthafte Hürde bei der biotechnologischen Verwendung von Minicircles dar. Eine ungewollte Integration durch zufällige Doppelstrangbrüche, sowohl im Minicircle als auch im zellulären Genom, kann die Zelle stärker als z.B. eine Inaktivierung der Genexpression in Minicircles beeinflussen und ist bei der Verwendung von S/MAR-basierten Minicircles nicht erwünscht.

Die Integration von Fremd-DNA wurde von einer Vielzahl an Arbeitsgruppen untersucht. Für die Integration wurde ein DNA-Reparatur-vermitteltes Modell entworfen. Ein Bruch in der genomischen DNA, egal ob Einzelstrang oder Doppelstrangbruch, aktiviert Faktoren der DNA-Reparatur. Jede DNA mit freien Enden kann Teil der DNA-Reparatur sein und damit integriert werden. Die Doppelstrangbrüche in der genomischen DNA können durch HR oder NHEJ repariert werden. Beide Mechanismen werden bei der Integration von Fremd-DNA in die genomische Wirts-DNA verwendet. In Zellen, in denen die Fremd-DNA durch die illegitime Integration in die genomische DNA eingebaut wurde, kann eine 80x höhere

Wahrscheinlichkeit für eine weitere Integration des selben Moleküls durch „*gene targeting*“, also über die homologe Rekombination, bestehen.<sup>[259]</sup>

Auf Basis der Sequenz des SAR E und des darin enthaltenen SAR M18 wurde mithilfe eines Sequenzabgleiches mit dem CHO-K1-Genom untersucht, ob durch eine Sequenzhomologie die Wahrscheinlichkeit zur Integration des Minicircles über das S/MAR-Element durch homologe Rekombination erhöht ist. Die Analyse wurde an der Universität Bielefeld (CeBiTec, Institut für Genomforschung und Systembiologie) durchgeführt. Für den Sequenzabgleich wurden genomische Contigs der CHO-K1-Zellen der Universität Bielefeld und des Beijing Genomics Institute (BGI) verwendet. Contigs sind sich überlappende DNA-Fragmente, die durch die bioanalytische Auswertung der Sequenzierung des CHO-K1-Genoms abgeleitet wurden. Teilsequenzen des SAR E kommen in unterschiedlicher Häufigkeit im CHO-K1-Genom vor (Tabelle 21). Für das SAR E wurden 5 Teilsequenzen gefunden, die 38-82 Nukleotide lang sind. Von diesen Teilsequenzen wurden nur eine Sequenz von 20 Nukleotiden der Teilsequenz 5 im SAR M18 gefunden, die 7-11x im CHO-K1-Genom vorkommt, die Sequenzhomologie der Teilsequenz 5 liegt bei 80-90 %. Die Wahrscheinlichkeit für eine initiale Integration über das SAR M18 durch homologe Rekombination ist also relativ gering, da nur ein sehr kleiner Bereich des SAR M18 eine Sequenzhomologie mit dem CHO-K1-Genom aufweist. Die Integration durch homologe Rekombination über das SAR E ist ebenfalls unwahrscheinlich, da dieses S/MAR-Element zwar 5 homologe Bereiche enthält, diese Bereiche jedoch allein oder auch zusammen genommen zu kurz für eine reproduzierbare homologe Rekombination sind. Für eine Integration eines Transgens durch homologe Rekombination ist eine Sequenzhomologie von 1,2-9,5 kbp nötig.<sup>[Review: 260]</sup> Es zeigt sich also, dass das SAR M18 die initiale Integration des Minicircles durch eventuelle Sequenzhomologien wahrscheinlich nicht fördert. Deshalb findet die Integration der Minicircle-DNA wahrscheinlich ungerichtet durch NHEJ statt.

Es wurde durch Zugabe von unterschiedlichen Agenzien zum Nährmedium versucht, die oft beobachteten ungewollten Integrationen des Minicircles zu verhindern. Die verwendeten Agenzien blockieren Moleküle der nicht-homologen und der homologen Rekombination. Es gibt eine Vielzahl von Inhibitoren, die alle die DNA-Doppelstrangreparatur blockieren sollen. In den meisten Fällen wurden diese Inhibitoren dadurch getestet, dass Strangbrüche durch Bestrahlung der Zellen oder durch Behandlung der Zellen mit chemotherapeutischen Agenzien eingefügt wurden und anschließend die Fähigkeit zur Strangbruchreparatur untersucht wurde. Durch diese Untersuchungen wurden z.B. die Poly(ADP-Ribose)

Polymerase-(PARP-)Inhibitoren AG14361<sup>[261]</sup>, NU1025<sup>[262]</sup>, NU1085<sup>[262]</sup>, CEP-6800<sup>[263]</sup>, 3'-Aminobenzamid (3'-AB) und DPQ<sup>[102]</sup> gefunden. Wortmannin und NU7026 blockieren die DNA-abhängige Proteinkinase.<sup>[264,265]</sup> Cadmium inhibiert dagegen u.a. die DNA-Ligasen.<sup>[266]</sup> Koffein und Pentoxifyllin sollen die Doppelstrangbruchererkennung durch den ATM/ATR-Komplex verhindern.<sup>[267]</sup>

Es wurden die Agenzien NU7026, 3'-AB, Cadmiumchlorid und Koffein verwendet (Tabelle 18). Damit sollten Moleküle der NHEJ (DNA-PK, Ligase IV), der alternativen NHEJ (aNHEJ; PARP-1, Ligase III) und der Doppelstrangbruchererkennung (ATM/ATR) inhibiert werden. CHO-K1-Zellen wurden unter Zugabe der Agenzien in unterschiedlicher Kombination (Tabelle 19) kultiviert und anschließend mit einem linearisierten Vektor, der neben einer EGFP-Expressionskassette zusätzlich eine Puromycin-Resistenzkassette enthielt, transfiziert (Abbildung 56).

Durch die Inhibition der Reparaturwege mit den Agenzien in unterschiedlichen Kombinationen wurde erwartet, dass weniger Integrationen des linearisierten Vektors stattfinden. Eine Puromycin-Resistenz konnte nur durch die Integration des linearisierten Vektors und dessen Expression hervorgerufen werden. Durch Messung des Anteils der viablen Zellen an der gesamten Zellpopulation über die Zeit von 20 Tagen konnte untersucht werden, durch welche Agenzien-Kombination möglicherweise am wenigsten Integrationen, d.h. am wenigsten resistente Zellen, entstanden sind.

Die Zellpopulationen, die mit Cadmiumchlorid behandelt wurden, sind auch ohne Selektionsdruck 3 dpt komplett abgestorben. Cadmium bindet an die funktionellen Thiol-Gruppen, die an der DNA-Ligation beteiligt sind. Aufgrund der hohen Affinität für Thiolgruppen wird davon ausgegangen, dass auch andere Cystein-reiche Proteine, wie die DNA-Helikase und Zinkfinger-enthaltende Proteine (z.B. Transkriptionsfaktor-IIH und -IIIA, PARP-1, DNA Polymerasen) durch Cadmium inhibiert werden.<sup>[266]</sup> Aufgrund dessen ist wahrscheinlich der Einfluss des Cadmiums, in der verwendeten Konzentration, auf die Zelle zu stark, so dass es zum Zelltod kommt.

Bei einer vollständigen Inhibierung der Doppelstrangreparatur kommt es ebenfalls zum Zelltod, deshalb ist es bei der Verwendung aller Agenzien wichtig, dass diese nicht vollständig inhibiert wird, sondern nur eine Reduzierung der Doppelstrangreparatur erreicht wird. Möglicherweise kann durch eine Optimierung der eingesetzten Cadmiumkonzentration

eine verbesserte Inhibierung der Doppelstrangreparatur ohne gleichzeitigen Zelltod erreicht werden.

Bei den mit Koffein behandelten Zellpopulationen konnte, im Vergleich zu den unbehandelten Zellpopulationen, eine Veränderung im Anteil der viablen Zellen während der Selektion beobachtet werden (Abbildung 57). Es scheint durch Koffein zu einer Inhibierung der Doppelstrangreparatur gekommen zu sein, da der Anteil der viablen Zellen während der Selektion im Vergleich mit den anderen Ansätzen langsamer steigt. Es ist jedoch auch möglich, dass Koffein, wie auch Cadmium, weitere zellschädigende Eigenschaften besitzt, sodass diese für das verlangsamte Wachstum verantwortlich sein könnten. Koffein zeigte von den untersuchten Agenzien das größte Potential zur Inhibition der illegitimen Integration. Neben der Inhibierung der ATM/ATR-Funktion vermittelt Koffein auch noch die Inhibition des Zellzyklusarrestes nach einem Doppelstrangbruch in der G1 und G2/M-Phase. Diese Eigenschaften teilt sich Koffein mit dem strukturell verwandten Pentoxifyllin und A-802710.<sup>[268]</sup> Die Blockierung der Doppelstrangerkennung durch ATM/ATR hat überwiegend Auswirkungen auf die homologe Rekombination (HR). Möglicherweise müssen beide DSB-Reparaturmechanismen blockiert werden, um Integrationen vollständig zu verhindern. Eine zusätzliche Blockierung des NHEJ könnte vielleicht zu einer weiteren Inhibierung der Integration von Fremd-DNA führen.

In einer DNA-PK-defizienten CHO-K1-Zelllinie, IRS-20, die also kein NHEJ durchführen kann, konnte durch eine Behandlung mit Koffein eine erhöhte Strahlungsanfälligkeit beobachtet werden.<sup>[269,270]</sup> Andere Untersuchungen zeigten, dass die Behandlung der NHEJ-defektiven CHO-K1-Zelllinie „xrs-1“, die ausschließlich die HR durchführen kann, mit Pentoxifyllin zu einer Erhöhung an freien ungepaarten DNA-Fragmenten führte.<sup>[271]</sup> Koffein und andere Methylxanthine inhibieren also überwiegend Prozesse der HR und zerstören die Kontrollpunkte im Zellzyklus. Dadurch kommt es bei Doppelstrangbrüchen zu irreparablen Schäden der DNA, sodass die dauerhafte Behandlung mit Koffein zur Apoptose der Zelle führt. Ein Ansatz für weitere Untersuchungen wäre also die Verwendung von S/MAR-Minicircles in NHEJ-defizienten Zellen, die mit Koffein oder einem anderen Methylxanthin behandelt wurden. In diesen Zellen sollte die Integration der Minicircles reduziert sein, da diese weder die homologe noch die nicht-homologe Doppelstrangbruchreparatur durchführen könnten. Damit sollte durch ein reduziertes Maß an illegitimen Integrationen die Wahrscheinlichkeit zur Generierung von exprimierenden Zellen mit ausschließlich episomaler Minicircle-DNA erhöht sein. Dies gilt jedoch nur solange die Zellen mit Koffein behandelt

werden würden. Wie bereits festgestellt, scheint es im Laufe der Kultivierung immer wieder zu Integrationen zu kommen, d.h. dass die Zellen dauerhaft mit Koffein behandelt werden müssten.

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Agenzien zur möglichen Inhibierung der illegitimen Integration zeigte nur Koffein ein gewisses Potential. Die Inhibition der ungewollten Integration erfordert jedoch weitere Untersuchungen mit unterschiedlichen Agenzien bzw. NHEJ-defizienten Zellen. Dabei muss jedoch bedacht werden, dass eventuell auch andere zelluläre Prozesse durch die verwendeten Agenzien beeinflusst werden könnten. Daher kann die Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Agenzien nur eine zusätzliche Maßnahme zur Inhibierung der funktionellen Integration sein. Wichtiger ist die Verwendung von Minicircles als zirkuläre Expressionskassette ohne zusätzliche Sequenzen, da damit die Wahrscheinlichkeit einer funktionellen Integration reduziert wäre.

#### **4.4.3. Durch die Transfektion mit Polyethylenimin (PEI) und die Verwendung von humanen Zellen könnten illegitime Integrationen verhindert werden**

Neben der Störung der Reparaturmechanismen in CHO-K1 ist die Verwendung von anderen Zelllinien mit geringer Neigung zur Rekombination von transfizierter DNA eine weitere Möglichkeit. Außer CHO-Zellen, gibt es eine Vielzahl an Mammaliazellen (z.B. HEK („human embryonic kidney“), BHK-21 („baby hamster kidney“), MDCK („Madin-Darby canine kidney“), Vero („african green monkey kidney“), Per.C6 („human fetal retinoblast“), NS0 („murine myeloma“) oder Hybridoma-Zellen), die für die Produktion von rekombinanten Proteinen verwendet werden können.

Eine ganz neue Zelllinie wurde von der Firma CEVEC entwickelt. Diese Zelllinie („CAP“) wurde von primären, humanen Amniozyten abgeleitet und soll für eine hohe und stabile Expression von komplexen Proteinen geeignet sein. Beim Vergleich der Transfektion von CAP- und CHO-K1-Zellen mit dem Minicircle SV40GFPS/MAR durch Elektroporation oder PEI zeigte sich, dass zwar die Transfektionseffizienz in CHO-K1-Zellen etwas höher ist, die Anzahl an viablen Zellen nach der Transfektion jedoch bei den CAP-Zellen höher ist (Tabelle 20). Die Transfizierbarkeit der CAP-Zelllinie unterscheidet sich also nur gering von der der CHO-K1-Zelllinie.

Die Transfektionseffizienz durch die Elektroporation war höher als durch PEI. Jedoch war der Anteil an viablen Zellen durch die Elektroporation auf 68-73 % gesunken (Tabelle 20). Dies hängt mit den Bedingungen der Elektroporation zusammen, die u.a. zu Strangbrüchen und

zum Zelltod führen. Der Anteil der viablen Zellen nach der Transfektion durch PEI deutet auf einen für die Zelle besser verträglichen DNA-Transfer hin. Dadurch wird die Gefahr von Strangbrüchen minimiert, sodass es zu weniger Integrationen des Minicircles kommen sollte. Die Transfektion von SAR M18-Minicircles durch PEI ist also zu bevorzugen, da, aufgrund der Vermeidung von zellulärem Stress durch diese Methode, im Vergleich zur Elektroporation die Wahrscheinlichkeit zur ungewollten Integration des Minicircle geringer sein sollte.

Die Untersuchung des Status der Minicircles durch eine Southern-Blot-Analyse ergab, dass alle Zellpopulationen den episomalen Minicircle enthielten (Abbildung 59). Zusätzlich zum episomalen Minicircle-Signal wiesen jedoch alle Zellpopulationen eine zusätzliche Bande auf („\*“), die in 4.5.2. näher betrachtet wird. Am meisten Signale zeigten die mittels Elektroporation transfizierten CHO-K1-Zellen („CHO NEON“). Die mittels PEI transfizierten CAP-Zellen zeigten dagegen, außer den beiden erwähnten Signalen, keine weiteren Signale, die auf zusätzliche Integration hinweisen würden. Durch die Nutzung von CAP-Zellen in Verbindung mit PEI scheint also die Gefahr einer Integration der Minicircles reduziert werden zu können.

Durch Vergleich der Signalintensität der episomalen Minicircle-DNA zeigt sich, dass die durch die Elektroporation transfizierten Zellen wahrscheinlich mehr Minicircle-DNA enthalten, als die durch PEI transfizierten Zellen (Abbildung 59). Es werden also nicht nur mehr Zellen durch die Elektroporation transfiziert, sondern jeweils auch mehr DNA pro Zelle transferiert. Anhand des Anteils an EGFP-exprimierenden Zellen nach zwei FACSSortierungen (Abbildung 58) ist jedoch zu erkennen, dass dies keine Vorteile bei einer Langzeitkultivierung hat, da der Anteil an EGFP-exprimierenden Zellen bei beiden Transfektionsmethoden den gleichen Verlauf zeigt und durch die FACSSortierung ohnehin auf einen Anteil von 100 % EGFP-exprimierender Zellen sortiert wird.

Da in diesem Fall keine Einzelzellklone untersucht wurden, kann nicht abschließend gesagt werden, ob durch die Nutzung der CAP-Zellen weniger Integrationen der Minicircles entstehen. DNA-Integrationen, die nur in einigen Zellen stattgefunden haben, könnte man durch die Untersuchung der gesamten Population nicht erkennen, da in diesem Fall das Signal zu schwach wäre. Außerdem scheint die Etablierung der Minicircles, wie bereits festgestellt, 16 dpt noch nicht abgeschlossen zu sein (s. 4.2.3.), d.h. dass durch die Untersuchung von Einzelzellklonen und deren Langzeituntersuchung erst abschließend geklärt werden kann, ob

die CAP-Zellen im Vergleich zu CHO-K1-Zellen für die Verwendung von SAR M18-Minircircles besser geeignet sind.

Es wird also deutlich, dass die Verwendung von SAR M18-Minircircles auch in der neuen CAP-Zelllinie zur Etablierung von episomaler DNA führt. Aufgrund der gewonnenen Daten scheinen die CAP-Zellen im Vergleich zu CHO-K1-Zellen für die ausschließlich episomale Etablierung der Minircircles besser geeignet zu sein. Um diese Aussage zu bestätigen, müssten jedoch zusätzliche Stabilitätsstudien mit Einzelzellklonen durchgeführt werden, in denen die episomale Etablierung der Minicircle-DNA näher untersucht werden könnte. Die Transfektion der Minircircles durch PEI scheint durch die Verringerung des zellulären Stresses während der Transfektion weniger DNA-Integrationen des Minircircles in das Wirtsgenom hervorzurufen.

#### **4.4.4. Reduzierung von illegitimer DNA-Integration durch alternative Selektionsmethoden**

Neben den genannten Ansätzen zur Reduzierung der Integrationen des Minircircles ist die Generierung von Einzelzellklonen ein weiterer Ansatzpunkt zur Reduzierung der ungewollten Integration der SAR M18-Minircircles.

In dieser Arbeit wurden die produzierenden Zellen ausschließlich durch FACS aufgrund ihrer EGFP-Expression angereichert. Die Sortierung der Zellen mittels FACS induziert zellulären Stress <sup>[258]</sup>, sodass es zu Strangbrüchen sowohl in der Minicircle-DNA als auch in der genomischen DNA kommen kann. Eine Alternative zu fluoreszierenden Selektionsmarkern, die eine Selektion mittels FACS erfordern, sind Antibiotikaresistenzgene. Durch die vermittelte Antibiotikaresistenz könnten die produzierenden Zellen angereichert werden. Der Anteil an prokaryotischer DNA im Minicircle würde dadurch jedoch steigen, sodass die Verwendung von diesen Resistenzgenen keine Alternative darstellt. Weiterhin könnten Gene verwendet werden, die einen Wachstumsvorteil vermitteln, z.B. das Gen für die cytosolische Form der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase <sup>[272]</sup>, die Pyruvat-Carboxylase <sup>[273]</sup>, die Dihydrofolat-Reduktase <sup>[274]</sup> oder die Glutamin-Synthetase.<sup>[275]</sup> Diese Gene vermitteln einen Wachstumsvorteil gegenüber nicht-transfizierten Zellen in einem definierten Nähr- bzw. Selektionsmedium, sodass dadurch produzierende Zellen angereichert werden könnten. Bei der Verwendung der wachstumsfördernden Gene ist jedoch zu beachten, dass, wie bereits in 4.1.3. erwähnt, diese zusammen mit dem „*gene of interest*“ in einer Expressionskassette, z.B. getrennt durch ein IRES-Element, im Minicircle vorliegen müssen. Wichtig ist jedoch dabei, dass eine Korrelation zwischen dem „*gene of duty*“ und dem „*gene of interest*“ vorliegt.

Weiterhin besteht die Möglichkeit ein Oberflächenmarker-Gen in Kombination mit dem „*gene of interest*“, getrennt durch ein IRES-Element, auf einem Minicircle zu verwenden. Durch die Verwendung von entsprechenden Antikörpern können dann produzierende Einzelklone durch magnetische Zellseparation (MACS) angereichert werden, sodass der zelluläre Stress ebenfalls verringert wird. In diesem Fall muss ebenfalls eine Korrelation zwischen dem „*gene of duty*“ und dem „*gene of interest*“ vorliegen. Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass nicht anhand der Expressionshöhe selektiert werden könnte, da bei dieser Methode nur zwischen exprimierenden und nicht-exprimierenden Zellen unterschieden werden kann.

Zusammenfassend wird deutlich, dass zur Reduzierung der illegitimen Integration von Minicircles unterschiedliche Ansätze von Bedeutung sein könnten. Zur Reduzierung der illegitimen Integration könnte es durch eine entsprechende Transfektions- und Selektionsmethode, durch transkriptionale Kontrollelemente, der Verwendung von bestimmten Agenzien zur Verhinderung der Doppelstrangbruchreparatur oder der Nutzung einer Zelllinie, die einen stabileren Karyotyp aufweist, kommen.

#### **4.5. Qualitative und quantitative Verbesserung der Generierung von Minicircle-DNA**

##### **4.5.1. Erhöhung der Ausbeute an Minicircle-DNA in *E. coli* EL250**

Bei der Generierung von Minicircles sind der Erhalt des superhelikalen Status, die Qualität und Quantität des aufgereinigten Minicircles wichtig. Zur Generierung der Minicircles wurde bisher in der Arbeitsgruppe „Epigenetische Regulationsmechanismen“ des HZI ausschließlich das thermische Induktionsverfahren verwendet, bei dem über eine thermische induzierbare, genomkodierte FLP-Rekombinase im *E. coli*-Stamm MM294 aus dem Ausgangsplasmid durch spezifische Rekombination der superhelikale (ccc-)Minicircle erzeugt wird. Die Verwendung einer Rekombinase garantiert dabei den Erhalt des superhelikalen Status des Minicircles, der für die weitere Verwendung als Vektor für die Transfektion eukaryotischer Zellen notwendig ist. Es ist keine permanente Expression der für die Generierung des Minicircles notwendigen FLP-Rekombinase möglich, da dies zu einer frühen Eliminierung des Ausgangsvektors führen würde. Deshalb muss die Expression der FLP-Rekombinase induziert werden. Dieses Verfahren ist wegen des erforderlichen, schnellen Temperaturwechsels nur im kleinen Maßstab durchführbar, weiterhin ist der Arbeitsaufwand relativ hoch und die Ausbeute an Minicircle gering.



Deshalb wurde ein L-Arabinose-vermitteltes FLP-Rekombinase-Induktionsverfahren entwickelt, das einerseits eine höhere Ausbeute zeigte und weiterhin einen geringeren Arbeitsaufwand benötigte. Zur Entwicklung dieses Systems wurden die *E. coli*-Stämme TopTen FLPE und EL250, bei denen das, in das *E. coli*-Genom integrierte, FLP-Rekombinase-Gen unter der Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren Promotors steht, verwendet. Dabei wurde festgestellt, dass die Induktion der Rekombinase in LB-Medium und TB-Medium nicht funktioniert, da in diesen Medien die L-Arabinose von den Zellen nur ungenügend aufgenommen wird (Daten nicht gezeigt). Stattdessen wurde die Glucose von den Zellen bevorzugt aufgenommen. Wenn Prokaryoten in einem Medium mit unterschiedlichen Zucker- bzw. C-Quellen kultiviert werden, zeigen sie oft einen katabolischen repressiven Effekt (Katabolitrepession), der die gleichzeitige Aufnahme unterschiedlicher C-Quellen verhindert. Die unterschiedlichen Zucker werden nacheinander aufgenommen und verbraucht, sodass mehrere exponentielle Wachstumsphasen beobachtet werden können (Diauxie). Es kommt also zunächst zum Verbrauch von Glucose, dann kommt es zu einem vorübergehenden Wachstumsstillstand, bevor die Verwertung anderer Zuckerquellen aufgenommen wird.<sup>[276]</sup> Durch Verwendung der L-Arabinose als einzige Zuckerquelle in M9-Minimalmedium konnte die Katabolitrepession umgangen und die Rekombination induziert werden.

Die Rekombinationseffizienz in *E. coli* EL250 war im Vergleich zu *E. coli* TopTen FLPE um den Faktor 2 höher (Abbildung 29). Dabei zeigte die Verwendung einer Übernachtskultur die höchste Ausbeute an Minicircle. Wahrscheinlich wird die L-Arabinose aus einer Kultur in der stabilen Wachstumsphase langsamer verstoffwechselt, sodass die L-Arabinose effizienter für die Induktion der Rekombination verwendet werden kann. Insgesamt blieb die FLP-Rekombinase-Induktion jedoch sehr ineffizient. Dies kann wahrscheinlich auf unterschiedliche Phänomene zurückgeführt werden. Die L-Arabinose wird neben der Induktion der FLP-Rekombinaseexpression auch als Energiequelle von den Zellen verwendet, d.h. dass die L-Arabinosekonzentration im Medium über die Zeit sinkt und damit die Induktion der FLP-Rekombinaseexpression zurückgeht. Der Prozess verläuft meist weitgehend unkontrolliert, d.h. wichtige Parameter, wie z.B. der pH-Wert, die Menge an gelöstem Sauerstoff und die L-Arabinosekonzentration im Nährmedium, werden nicht kontrolliert. Dies führt dazu, dass die hohe Atmungsrate der Bakterien die Rate des Sauerstofftransfers in die Kultur übersteigt. Hieraus resultiert eine Sauerstoffverarmung und damit eine Verringerung der Proteinproduktion, hier: der FLP-Rekombinase-Expression. Dabei passen sie ihren Stoffwechsel den anaeroben Kulturbedingungen an und setzen

Metabolite frei, die den pH-Wert senken, sodass dadurch die FLP-Rekombinase-Expression sinkt. Um eine höhere Ausbeute an Minicircle zu erlangen, ist offensichtlich eine optimierte und kontrollierte Prozessführung nötig.

Bei der Verwendung von *E. coli* EL250 betrug die optimale Induktionszeit einer Übernachtkultur mit 0,3 % (w/v) L-Arabinose in M9-Minimalmedium 4,5 h (Abbildung 30). Die Rekombination ist jedoch unvollständig, d.h. eine große Menge an Ausgangsplasmid wird nicht zum Miniplasmid und Minicircle rekombiniert (Abbildung 29 (A +B)). Nach der Präparation der Plasmid-DNA aus den *E. coli*-Zellen nach der Rekombination ist der Anteil des Miniplasids jeweils höher als der des Minicircles (Tabelle 14). Da das Miniplasmid einen prokaryotischen Replikationsursprung besitzt, der Minicircle dagegen nicht, beginnt sofort nach der Rekombination der Abbau bzw. die Verdünnung des Minicircles im Zuge der Zellproliferation, während das Miniplasmid und das Ausgangsplasmid weiter repliziert werden. Bei einer Induktionszeit > 4,5 h mit L-Arabinose sank der Anteil der Minicircle-DNA an der gesamten Plasmid-DNA, d.h. das Verhältnis von Minicircle zu Miniplasmid sank über die Zeit. Die Induktionszeit sollte daher so kurz wie möglich, jedoch länger als 3,5 h, gewählt werden, um das „Herausverdünnen“ der Minicircle-DNA zu verhindern. Weiterhin hat sich gezeigt, dass die L-Arabinose-Induktion teilweise nicht reproduzierbare Ergebnisse lieferte bzw. schwer steuerbar war, sodass eine andere Methode zur Generierung von Minicircle-DNA benötigt wurde (s. 4.5.2.).

Es konnte zwar die Generierung von ccc-Minicircle-DNA durch spezifische Rekombinase-induzierte Rekombination vereinfacht werden. Obwohl die Rekombinationseffizienz im Vergleich zur hitzeinduzierten Rekombination von 5 % auf 19 % gesteigert werden konnte, ist diese Ausbeute noch nicht zufriedenstellend, da die Generierung einer ausreichenden Menge an ccc-Minicircles für die Herstellung von rekombinanten Zellen in der Biotechnologie bzw. von Gentherapie-Vektoren durch diese Methode einen zu hohen Material- und Arbeitsaufwand erfordern würde.

#### **4.5.2. Die „in vitro“-Generierung von ccc-Minicircles erfordert keine zusätzlichen Sequenzen und ergibt hochreine ccc-Minicircle-DNA**

Das in 4.5.1. vorgestellte Verfahren ist nicht in einem großen bzw. industriellen Maßstab durchführbar, außerdem ist es aufgrund der geringen Ausbeute unwirtschaftlich.

Ein anderer bzw. kommerzieller Ansatz (Firma: PlasmidFactory) zur Generierung von Minicircle-DNA umfasst ebenfalls die Rekombination in *E. coli*.<sup>[277]</sup> In diesem Fall wird

jedoch eine effizientere Rekombinase, die ParA Resolvase, verwendet. Die Induktion der Rekombination erfolgt ebenfalls durch L-Arabinose, jedoch nur für maximal 1 h. Damit wird der Verlust des Minicircles im Zuge der Replikation verhindert. Die Aufreinigung der generierten Minicircle erfolgt durch ein säulenchromatographisches System. In diesem Fall wird die Bindung spezieller, an eine stationäre Phase gebundener, Proteine an die im Minicircle enthaltene Sequenz des Lactose-Operators (LacO) genutzt („*recombination based plasmid separation*“-Technologie, RBPS). Die generierte und aufgereinigte DNA besteht dabei aus 99 % ccc-Minicircle-Monomer, die Reinheit dieser Minicircle-DNA ist somit sehr hoch. Durch dieses Verfahren kann Minicircle-DNA im industriellen Maßstab (1 mg mL<sup>-1</sup>) hergestellt werden. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist jedoch die Nutzung einer prokaryotischen LacO-Sequenz, sodass die Gefahr besteht, dass damit die funktionellen und regulatorischen Vorteile der Minicircles gegenüber klassischer Plasmid-DNA verschwinden. Weiterhin steigt durch die zusätzliche Sequenz die Gefahr einer funktionellen Integration des Minicircles in das Wirtsgenom, da Strangbrüche in dieser Region die Funktionalität der Expressionskassette nicht beeinflussen. Somit ist bei der Verwendung dieser Minicircles unklar, ob die Expression von der episomalen oder der integrierten DNA stammt. Der durch dieses Verfahren hergestellte und kommerziell erhältliche Minicircle SV40GFPS/MAR wurde in dieser Arbeit zur Untersuchung der episomalen Etablierung des Minicircles in CHO-K1- und CAP-Zellen verwendet (3.3.1.-3.3.4.). Durch eine Southern Blot-Analyse (Abbildung 51, Abbildung 52 und Abbildung 59) konnte, nach der Transfektion der eukaryotischen Zellen mit diesem Minicircle, jeweils ein zusätzliches Signal („\*“) beobachtet werden. Dieses Signal entstand bei unterschiedlichen Transfektionen und Zelllinien. Um eine Integration kann es sich dabei nicht handeln, da das Signal ebenfalls bei der jeweiligen Positivkontrolle, bestehend aus genomischer Wildtyp-DNA und ccc-Minicircle, auftrat. Weiterhin würde bei CHO-K1- und CAP-Zellen dieselbe Integration stattfinden. Dies lässt auf eine Verunreinigung der transfizierten Minicircle-DNA mit z.B. Ausgangsplasmid schließen. Es könnte also auch bei dem, über die LacO-Sequenz und einer Säulenchromatographie aufgereinigten, kommerziell erhältlichen Minicircle SV40GFPS/MAR eine Verunreinigung durch den Ausgangsvektor vorliegen.

Um die Ausbeute an Minicircle-DNA im Labormaßstab zu erhöhen und um Minicircles herzustellen, die ausschließlich aus einer zirkulären Expressionskassette bestehen, wurde ein Verfahren entwickelt, dass auf den Einsatz von Rekombinasen zur Generierung von Minicircles und auf überflüssige bakterielle Sequenzen im Minicircle komplett verzichtet. Durch dieses Verfahren kann aus den meisten Plasmiden ohne vorheriges Einfügen von

Rekombinaseerkennungsstellen Minicircle-DNA generiert werden. Weiterhin konnte die Ausbeute und Reinheit der Minicircles erhöht werden. Bei diesem Verfahren wird der Ausgangsvektor in einem *E. coli*-Stamm (z.B. XL1-Blue) in hoher Kopienzahl generiert, das eukaryotische Fragment des Vektors isoliert, durch T4-Ligase ligiert und durch Gyrase-Behandlung negativ-superhelikal verdreht. Im Vergleich zur ortsspezifischen Rekombination in *E. coli* EL250 ist die Ausbeute, bezogen auf das eingesetzte Bakterienvolumen zu Beginn der Minicircle-Herstellung, mit diesem Verfahren 10-15× höher. Der Grund dafür ist die Effizienz der einzelnen Prozessschritte und die höhere Kopienzahl des *E. coli*-Stammes XL1 Blue. Der Ausgangsvektor wird bei der Restriktion nahezu vollständig in Minicircle und Miniplasmid aufgetrennt. Nach der Aufreinigung des linearen Minicircles erfolgt die Rezirkularisierung und Verdrillung des Minicircles mit ebenfalls hoher Effizienz. Die anschließende 2. gelelektrophoretische Aufreinigung des ccc-Minicircles sorgt für die Abtrennung von unerwünschten DNA-Formen (Konkatemere, lineare und oc-DNA).

Die „*in vitro*“-Generierung der Minicircles ist im Vergleich zu den anderen Verfahren mit einem geringeren Materialaufwand verbunden und kann in einem größeren Maßstab durchgeführt werden. Der limitierende Schritt bei dieser Methode ist jedoch die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA. Die 2. gelelektrophoretische, verlustanfällige Aufreinigung des ccc-Minicircles könnte durch eine Affinitätschromatographie mit immobilisierten, basischen Aminosäuren (Histidin, Arginin, Lysin) ersetzt werden. Mit den immobilisierten Aminosäuren kann ccc-DNA von linearer und oc-DNA abgetrennt werden.<sup>[278,279,280]</sup> Die Elution der ccc-DNA erfolgt dabei durch Steigerung der NaCl-Konzentration. Vorversuche zur Aufreinigung der ccc-Minicircle mit Lysine-Sepharose verliefen vielversprechend (Daten nicht gezeigt) und führten zu einer deutlichen Anreicherung von ccc-DNA. Durch die Affinitätschromatographie mit basischen Aminosäuren könnte auch in großem Maßstab ccc-DNA aufgereinigt werden, sodass die 2. gelelektrophoretische Auftrennung und Aufreinigung entfallen könnte.

Die Reinheit der Minicircle-DNA der unterschiedlichen Verfahren wurde durch zwei spezifische PCRs auf die Miniplasmid-Region und auf den Ursprungsvektor untersucht (Abbildung 32). Die durch ortsspezifische Rekombination generierte Minicircle-DNA enthielt nach der Aufreinigung weiterhin den Ursprungsvektor und eventuell auch das Miniplasmid. Der „*in vitro*“-Minicircle enthielt offensichtlich nur das Minicircle-Monomer. Durch das „*in vitro*“-Verfahren können also, wahrscheinlich aufgrund der zweimaligen

gelelektrophoretischen Aufreinigung, Minicircles generiert werden, die frei von DNA-Kontaminationen (lineare DNA, oc-DNA oder Konkatemeren) sind.

Durch eine partielle Sequenzierung konnte gezeigt werden, dass der „*in vitro*“-Minicircle bezüglich seiner Sequenz dem durch ortsspezifischer Rekombination generierten Minicircle entspricht (Abbildung 33).

#### **4.5.3. Durch die DNA-Gyrase können nur zirkuläre DNA-Moleküle negativ verdrillt und unterschiedliche Topoisomerverteilungen erreicht werden**

Die durch die DNA-Gyrasebehandlung eingeführte negativ-superhelikale (ccc-)Form des „*in vitro*“-Minicircles wurde durch die Auftrennung der DNA in einem Chloroquin-Agarosegel überprüft. Zum Vergleich wurde ebenfalls der durch ortsspezifische Rekombination generierte Minicircles aufgetrennt (Abbildung 35). Dabei zeigte sich, dass der „*in vitro*“-Minicircle eine größere Anzahl an Verdrillungen aufwies bzw. stärker verdrillt war. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bei der Rezirkularisierung der Minicircles mit der T4-Ligase neben oc-/„*nicked*“-DNA und Konkatemeren überwiegend positiv verdrillte Minicircles entstehen (Abbildung 35). Durch Inkubation von negativ verdrillter Plasmid DNA mit T4-Ligase konnte ausgeschlossen werden, dass die T4-Ligase auch in negativ-verdrillte DNA positive Verdrillungen einfügen kann (Daten nicht gezeigt). Das Einfügen positiver Verdrillung ist also weniger eine Fähigkeit der T4-Ligase, sondern eher ein notwendiges gerichtetes Verhalten bei der Verknüpfung von zwei DNA-Doppelsträngen. Die Anzahl der eingefügten positiven Verdrillungen könnte durch ein Agarosegel ohne Ethidiumbromidzusatz nachgewiesen werden, da sich in diesem die positiv verdrillten Topoisomere auftrennen lassen.<sup>[281]</sup> Positive Verdrillungen treten ebenfalls bei der Entfernung von negativen Verdrillungen durch die DNA-Topoisomerase I auf (Abbildung 27). Dies ist wahrscheinlich ebenfalls ein notwendiges Verhalten bei der Relaxation der negativ verdrillten DNA, wobei sich die Anzahl der positiven Verdrillungen auf 1-2 Superhelices beschränkt.

Wie bereits erwähnt, liegt nach der Rezirkularisierung ein geringer Teil an oc-/„*nicked*“-DNA vor. In Abbildung 39 zeigt sich, dass bei der DNA-Gyrasebehandlung die Menge an linearer DNA und oc-/„*nicked*“-DNA unverändert bleibt. Die als oc-/„*nicked*“-DNA bezeichnete DNA-Form ist daher wahrscheinlich überwiegend „*nicked*“-DNA, d.h. zirkuläre DNA mit einem Strangbruch, die nicht als Substrat für die DNA-Gyrase dient. Bei der Ligation durch die T4-Ligase entsteht also, möglicherweise durch das Abstoppen der enzymatischen Reaktion bei 65 °C, regelmäßig „*nicked*“-DNA. Diese Form wird, wie auch alle anderen nicht

benötigten DNA-Formen, im Laufe der Aufreinigung des negativ-verdrillten Minicircles entfernt.

Beim Vergleich des „*in vitro*“-Minicircles in Abbildung 35 mit dem in Abbildung 37, zeigt sich, dass durch eine unterschiedliche Inkubationsdauer mit der DNA-Gyrase unterschiedlich stark-negativ verdrillte Topoisomerverteilungen erreicht werden können. Nach 10 min. sind nur schwach-negativ verdrillte und nach 2 h bereits stark-negativ verdrillte Minicircles zu erkennen. Weiterhin wurde jedoch in Abbildung 38 deutlich, dass die DNA-Gyrase ebenfalls negative Verdrillungen entfernen kann. In diesem Fall waren wahrscheinlich Komponenten (z.B. ATP) des empfindlichen Reaktionspuffers der DNA-Gyrase, der bei -70 °C gelagert werden muss, schadhaft bzw. zerstört worden. Möglicherweise ändert sich ohne den Cofaktor ATP die Funktion der DNA-Gyrase. Dies wurde für eine Topoisomerase (Reverse Gyrase) aus *Archaeoglobus fulgidus* (*A. fulgidus*) beobachtet.<sup>[281]</sup> Die Funktion dieses Enzyms unterscheidet sich je nach verwendetem Cofaktor. Durch die Zugabe von ATP, werden positive Verdrillungen eingefügt, durch AMP und AMPPNP entstehen negative Verdrillungen. Ohne Cofaktor entstehen ebenfalls negative Verdrillungen durch die Reverse Gyrase. Die genaue Einhaltung der geforderten Reaktionsbedingungen ist also bei der DNA-Gyrasebehandlung der rezirkularisierten DNA sehr wichtig, da sonst möglicherweise die DNA-Gyraseaktivität nicht reproduzierbar sein könnte.

Durch die DNA-Gyrase können also unterschiedliche Verteilungen an negativ-verdrillten Minicircle-Topoisomeren erreicht werden. Für die gezielte, vorhersagbare Generierung von bestimmten ccc-Topoisomerverteilungen ist jedoch eine weitere Validierung des Systems, bezüglich der eingesetzten DNA-Menge, der Enzymmenge, den Reaktionsbedingungen und der Inkubationszeit, nötig. Bei der Rezirkularisierung durch die T4-Ligase und wahrscheinlich auch bei der Verdrillung durch die DNA-Gyrase entsteht zirkuläre DNA mit einem Strangbruch („*nicked*“-DNA). Die Entfernung dieser DNA-Form, wie auch aller anderen nicht benötigten DNA-Formen, ist bei der Herstellung des „*in vitro*“-Minicircles von großer Bedeutung. Durch die 2. gelelektrophoretische Auftrennung und Aufreinigung des ccc-Minicircles kann dies jedoch, wie bereits gezeigt, gewährleistet werden.

#### **4.5.4. Stark-negativ verdrillte Minicircle-DNA vermittelt in CHO-K1-Zellen die stabilste Expression nach der Transfektion**

In Untersuchungen wurde festgestellt, dass durch die negative ccc-Topoisomerform der DNA eine höhere Transfektionseffizienz erreicht wird.<sup>[282]</sup> Bisher war jedoch unklar, welche ccc-

Topoisomerform tatsächlich eine verbesserte Transfektionseffizienz zeigt, also ob niedrig verdrillte DNA dieselbe Transfektionseffizienz besitzt wie stark verdrillte DNA. Weiterhin ist interessant, ob die vermittelte Expression durch die unterschiedlichen ccc-Topoisomere unterschiedlich ist.

Deshalb wurden unterschiedliche ccc-Topoisomerverteilungen des Minicircles SV40GFPS/MAR durch das „*in vitro*“-Verfahren generiert und in CHO-K1-Suspensionszellen mittels PEI transfiziert. Die Transfektionseffizienz und der Anteil an EGFP-exprimierenden Zellen waren mit den religierten, positiv-verdrillten („+“) und den schwach-negativ verdrillten („-“) Minicircles am höchsten (Tabelle 15). Für die Transfektion ist somit eher eine schwache Verdrillung von Vorteil, da in dieser Topoisomer-Form wahrscheinlich die Zugänglichkeit der DNA für die ionischen Interaktionen mit dem PEI gesteigert ist. Die mittlere EGFP-Expression ist bei diesen beiden Formen ebenfalls am höchsten. Dies zeigt erneut, dass nicht nur mehr Zellen pro Population, sondern auch mehr DNA pro Zelle transfiziert wurde oder die Transfektion mit dieser schneller verlief, sodass sich 1 dpt bereits mehr EGFP in der Zelle angesammelt hat. Die Transfektionseffizienz wird also durch die unterschiedlichen ccc-Topoisomer-Verteilungen beeinflusst. Bei den mit religierter Minicircle-DNA transfizierten Zellen („+“) sank der Anteil an EGFP-exprimierenden Zellen am schnellsten. Die unterschiedlichen Expressionsverhalten scheinen sich jedoch anzugleichen, d.h. dass sich möglicherweise über die Zeit eine bestimmte EGFP-Expression entwickelt. In diesem Fall hätte die Verdrillung der Minicircles nur in der Zeit direkt nach der Transfektion einen Einfluß auf das Expressionsverhalten. Um dies zu überprüfen, sind offensichtlich noch weitere Studien über eine längere Zeit erforderlich, sodass in dieser Arbeit keine abschließende Aussage getroffen werden kann.

Es wird also deutlich, dass schwach-negativ verdrillte bzw. religierte DNA für eine Transfektion mit PEI von Vorteil ist. Die genaue Validierung der DNA-Verdrillung durch die DNA-Gyrase und die Untersuchung der Verdrillung der Minicircles in Säugerzellen über einen längeren Zeitraum könnte möglicherweise durch die Verwendung von definierten ccc-Topoisomerverteilungen zu einer stabileren Expression und möglicherweise auch zu einer verbesserten Etablierung des ccc-Minicircles führen. Die Untersuchung der Etablierung der Minicircles nach der Transfektion der unterschiedlich stark verdrillten Minicircles wäre also ein weiterer Ansatzpunkt zur möglichen Verbesserung der episomalen Minicircle-Etablierung im Zellkern.

Bei der Untersuchung der ccc-Topoisomere in den CHO-K1-Zellen (Abbildung 42) durch ein Chloroquin-Agarosegel konnten 1 dpt nur noch zwei Minicircle-Topoisomerformen, die oc-/„*nicked*“-Form und die stark-negativ verdrillte Form, detektiert werden. Sogar die religierten, positiv-verdrillten Minicircles scheinen nach der Transfektion überwiegend negativ-verdrillt zu sein. Bei der oc-/„*nicked*“-Form könnte es sich um Minicircles handeln, bei denen zum Zeitpunkt der Aufreinigung die Verdrillungen bzw. Superhelices für die Transkription entfernt wurden. Es zeigt sich also, dass die ccc-Minicircles bereits einen Tag nach der Transfektion, möglicherweise aufgrund der startenden Transkription, durch zelluläre Topoisomerasen prozessiert wurden und ausschließlich stark-negativ verdrillte Minicircle-Topoisomerformen in den Zellen vorliegen.

Im Gegensatz zu Prokaryoten, bei denen die DNA-Verdrillung überwiegend aufgrund des Gleichgewichtes zwischen der Aktivität der DNA-Gyrase- und der -Topoisomerase I zustande kommt, gibt es bei Eukaryoten zwei unterschiedliche Wege, um die Verdrillung zu beeinflussen. Diese beiden Wege können unabhängig voneinander oder zusammen die DNA beeinflussen. Der erste Weg umfasst die Verdrillung aufgrund der Bindung der DNA-Doppelhelix mit Histon-Oktameren bei der Entstehung von Nukleosomen („solenoidale Verdrillung“).<sup>[283]</sup> Ein Nukleosom entspricht einer negativen Verdrillung. Deshalb senkt die Bindung von Nukleosomen in Anwesenheit von zellulären Topoisomerasen die „*linking number*“ der DNA. Die Bildung von Nukleosomen wird jedoch von verschiedenen Sequenzen, z.B. dem S/MAR-Element, beeinflusst bzw. inhibiert. Der zweite Weg beruht auf der direkten Einführung von negativen Verdrillungen durch Gyrase-ähnliche Enzymen in der Zelle („plektonemische Verdrillung“). Bei den hier verwendeten Minicircles werden wahrscheinlich im Zuge der Transkription, also plektonemisch, die Verdrillungen eingefügt, da die Bildung von Nukleosomen in dieser frühen Phase sehr unwahrscheinlich ist.

Durch die Generierung von Minicircle-DNA mit einem bestimmten Verdrillungsgrad könnte also die im Zuge der Transfektion in den CHO-K1-Zellen entstehende ccc-Topoisomerform imitiert werden, sodass es möglicherweise zu einer verbesserten Etablierung der Minicircles in den Zellen kommen kann. Die Einstellung der definierten ccc-Topoisomerverteilung ist, wie bereits erwähnt, nur mit der in dieser Arbeit entwickelten „*in vitro*“-Methode zur Generierung von ccc-Minicircles möglich.



#### 4.6.            **Fazit und Ausblick**

In dieser Arbeit wurde der Einsatz von SAR M18-basierten Minicircles für die Herstellung rekombinanter Proteine untersucht. Die Untersuchungen umfassten dabei die Generierung von hochreiner Minicircle-DNA, den Transfer der Minicircle-DNA in Säugerzellen, die episomale Etablierung und Stabilität der Minicircles in den Wirtszellen und die durch Minicircles vermittelte Expressionsleistung.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die verwendete Minicircle-DNA neben der vorherrschenden episomalen Etablierung zusätzlich ungerichtet in das Genom von Säugerzellen integrieren kann. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die episomale Etablierung der Minicircles in CHO-K1-Zellen auch in der sog „stabilen“ Expressionsphase nicht abgeschlossen ist und die episomalen Minicircles durch das umgebende Chromatin durch Methylierung und Histonmodifikationen beeinflusst werden können bzw. der Rekombination in CHO-K1-Zellen unterworfen sind. Dadurch kann es entweder zum Verlust der Minicircles oder zum „*gene-silencing*“ über die Zeit kommen. Dies bedeutet, dass die exprimierenden Zellen durch die ständige Veränderung der Expression in CHO-K1-Zellen bis zu einem bestimmten Zeitpunkt in regelmäßigen Abständen angereichert werden müssten. Aufgrund dessen sind die in dieser Arbeit verwendeten Minicircles in Kombination mit der CHO-K1-Zelllinie, die eine hohe Tendenz zur Rekombination bzw. ein instabiles Genom aufweist, für die Herstellung von rekombinanten Proteintherapeutika unter industriellen Standards zurzeit nicht von Vorteil gegenüber herkömmlichen Verfahren (z.B. „*random integration*“ der Expressionskassette).

In dieser Arbeit konnte kein Einzelzellklon mit ausschließlich episomaler Minicircle-DNA generiert werden, da offensichtlich die Rate der illegitimen Integration der Minicircle-DNA in den CHO-K1-Zellen zu hoch war. Zur Reduzierung der illegitimen Integration von Minicircles wurden in dieser Arbeit unterschiedliche Lösungsansätze entwickelt. Die illegitime Integration könnte durch eine entsprechende Transfektions- und Selektionsmethode, durch transkriptionale Kontrollelemente, der Verwendung von bestimmten Agenzien oder der Nutzung einer Zelllinie, die einen stabileren Karyotyp aufweist, inhibiert werden. Am wichtigsten ist wahrscheinlich die Nutzung einer Zelllinie mit einem stabilen Karyotyp, da möglicherweise dadurch die anderen Lösungsansätze, z.B. die Verwendung von bestimmten Agenzien, nicht mehr benötigt werden. Alle erwähnten Ansätze könnten, durch die Inhibierung der illegitimen Integration, die Wahrscheinlichkeit zur Selektion von Einzelzellklonen mit ausschließlich episomaler Minicircle-DNA erhöhen. Das Auffinden von

Einzelzellklonen mit ausschließlich episomaler Minicircle-DNA ist für die Bearbeitung von grundlagenorientierten und biotechnologischen Fragestellungen von großer Bedeutung.

Die Erweiterung bzw. die Verbesserung des Minicircle-Systems und deren Nutzung zur Herstellung von rekombinanten Proteinen setzt die reproduzierbare Generierung von Einzelzellklonen mit ausschließlich episomal etablierten Minicircles in großer Zahl voraus. Deshalb muss die Generierung von Einzelklonen mit ausschließlich episomaler Minicircle-DNA bei zukünftigen Untersuchungen im Vordergrund stehen, da somit die Minicircles auch für die industriellen Herstellung von rekombinanten Proteinen verwendet werden könnten.

#### **4.6.1. Korrelation der Expression des „*gene of duty*“ und des „*gene of interest*“**

Die Korrelation der Expression zweier rekombinanter Proteine könnte durch Verbindung der unabhängigen Gene mittels eines IRES-Elementes erreicht werden. Durch die Verwendung des IRES-Elementes würde eine bicistronische Expressionskassette aus dem „*gene of duty*“ und dem „*gene of interest*“ entstehen. Die beste Variante ist jedoch die Verwendung einer monocistronischen Expressionskassette. Dabei müsste das „*gene of interest*“ auch gleichzeitig als „*gene of duty*“ verwendet werden können, d.h. die Zellen müssten immer direkt auf das „*product of interest*“ selektiert werden.

Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung von Furin-Schnittstellen in einem Polypeptid. Die Expressionskassette enthält bei diesem System das „*gene of interest*“ und das „*gene of duty*“ getrennt durch eine Sequenz, die für die Furin-Schnittstelle codiert. Furin ist eine Endoprotease, die im Golgi-Apparat lokalisiert ist. Es entsteht also ein Polypeptid, dass im Golgi-Apparat in die einzelnen Proteine geschnitten wird. Ayoubi *et al.* <sup>[284]</sup> haben eine CHO dhfr<sup>-</sup>-Zelllinie mit einer stabilen Furin-Expression generiert und konnten in diesen Zellen zwei unterschiedliche rekombinante Proteine (2x „*gene of interest*“) generieren.

#### **4.6.2. Verwendung von anderen S/MAR-Elementen**

Eine Vielzahl an bisher bekannten S/MAR-Elementen, die möglicherweise für die episomale Etablierung von Minicircles verwendet werden könnten, sind in der „*S/MARt Database*“ <sup>[285]</sup> abgelegt. Durch die Erstellung eines SIDD-Profiles ist die Reduzierung dieser S/MAR-Elemente auf aussichtsreiche „S/MAR-Kandidaten“ zur Etablierung von episomalen Minicircles möglich. Die gefundenen Minicircle-S/MAR-Kombinationen könnten dann in Säugerzellen im Hinblick auf die Etablierungsrate und Stabilität untersucht bzw. verglichen

werden. S. Binius <sup>[286]</sup> hat z.B. das Potential einer neuartigen Sequenz („CMV-S/MAR“) für die Verlängerung der transienten Expression von rekombinanten Proteinen gezeigt.

#### **4.6.3. Verbesserung der „in vitro“-Minicircle-Herstellung**

Durch die Entfernung der überflüssigen DNA-Sequenzen, sodass der Minicircle nur noch aus einer zirkulären Expressionskassette besteht, würde die Wahrscheinlichkeit einer funktionellen Integration des Minicircles in das Wirtsgenom sinken. Die einzige Methode zur Generierung dieser optimierten Minicircles ist die in dieser Arbeit entwickelte „in vitro“-Methode, da bei dieser Methode nur eine Erkennungsstelle für ein Restriktionsenzym, meist 6 Nukleotide lang, vorhanden sein muss. Die Selektion der exprimierenden Einzelzellklone könnte somit in Einzelzellklonen mit ausschließlich episomaler DNA resultieren.

Bei der Ligation des aufgereinigten, linearen Minicircles nach dem Restriktionsverdau kommt es neben der Bildung von Minicircle-Monomeren auch zur Bildung von Minicircle-Konkatemeren. Dies könnte durch eine sogenannte „cut-ligation“ reduziert werden. Der Minicircle wird dabei zunächst durch die Restriktion mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen, durch die komplementäre überhängende DNA-Enden entstehen (z.B. BamHI und BglII), aus dem Ursprungsvektor geschnitten und aufgereinigt. Der aufgereinigte, lineare Minicircle mit den beiden komplementären Enden wird nun, wie bisher auch, durch eine T4-Ligase religiert. Dem Ligationsansatz werden jedoch die beiden vorher verwendeten Restriktionsenzyme (z.B. BamHI und BglII) zugefügt. Bei einer Konkatermbildung, bei der wieder die jeweiligen Restriktionserkennungsstellen entstehen („head-to-head“-Verknüpfung), wird das Konkaterm sofort wieder geschnitten. Bei der Rezirkularisierung des Minicircle-Monomers entsteht dagegen keine funktionelle Restriktionserkennungsstelle. Bei einer „head-to-tail“-Verknüpfung entsteht jedoch auch keine funktionelle Restriktionserkennungsstelle, sodass die Bildung dieses Konkatemers nicht verhindert werden kann. Die „cut-ligation“ könnte also die Konkatermbildung nicht vollständig verhindern, sie jedoch reduzieren.

Weiterhin könnte, wie bereits erwähnt, die zweite gelelektrophoretische Aufreinigung des ccc-Minicircles durch eine Affinitätschromatographie mit immobilisierten, basischen Aminosäuren (Histidin, Arginin, Lysin) ersetzt werden. Mit den immobilisierten Aminosäuren kann ccc-DNA von linearer und oc-DNA abgetrennt werden. Durch die Affinitätschromatographie wäre also die Aufreinigung von ccc-Minicircle-DNA möglich.

---

## **5. Material und Methoden**

### **5.1. Geräte**

Kolbenhubpipetten	GILSON Pipetman EPPENDORF Reference
8-Kanal-Pipette	MATRIX Impact-2
Tischzentrifuge	Minifuge HERAEUS-CHRIST, Biofuge pico EPPENDORF Centrifuge 5417C EPPENDORF Centrifuge 5415 C EPPENDORF Centrifuge 5418 VWR Galaxy MiniStar
Kühlzentrifuge	EPPENDORF Centrifuge 5415 R Minifuge HERAEUS-CHRIST, Biofuge fresco HERAEUS Multifuge 3SR+ HERAEUS Biofuge 15 SORVALL RC 5C (Rotoren: SS-34, GSA)
Vakuumzentrifuge	SAVANT INSTRUMENTS SpeedVac concentrator mit Ölschieber Vakuumpumpe und Kühlfalle EPPENDORF Concentrator 5301
Spektrophotometer	THERMO FISHER SCIENTIFIC NanoDrop-1000 IMPLEN NanoPhotometer
Gelelektrophoresekammer	GIBCO BRL 58 GIBCO BRL 11-14 BIOMETRA Compact XS/S BIOMETRA Compact M PEQLAB PerfectBlue Gelsystem Mini S
Netzgeräte	BIORAD Power Pac 200 BIORAD Power Pac 300 BIOMETRA Standard Power Pack P25 BIOMETRA Power Pack P25T

---

Lichtmikroskop	OLYMPUS CKX 41 NIKON TMS LEITZ Labovert FS ZEISS Axiovert TV 135 mit Fluoreszenzvorrichtung MOTIC AE31
Inverses Fluoreszenzmikroskop	ZEISS Axiovert 135 TV
Mikrotiterplatten-Lesegerät	BIORAD Modell 3550-UV Microplate Reader
UV-Kammer	VILBER LOURMAT Biodoc
Durchflusszytometer	BD FACScan BD FACSAria BD FACSCalibur BD Influx MILLIPORE Guava EasyCyte plus
Zellzählsystem	SCHÄRFE SYSTEM Casy 1 Cell Counter
CO <sub>2</sub> -Inkubator	FORMA SCIENTIFIC Water-jacked Incubator Modell 3336 FORMA SCIENTIFIC CO <sub>2</sub> -Inkubator Modell 3111 HERAEUS Hera cell INFORS HT Multitron
Sterilwerkbank	NUAIRE Labgard Claas II HERAEUS Herasafe HSP 18 BAKER COMPANY Sterilgard Class II Type A/B3
pH-Meter	HANNA INSTRUMENTS HI 221 KNICK 766 Calimatic
Brutschrank (Prokaryoten)	HERAEUS Incubator mit SARTORIUS Certomat MOII Schüttler
Brutschrank (Eukaryoten)	SANYO CO <sub>2</sub> Incubator MCO-20AIC
Mini-Schüttler (Eukaryoten)	BELLCO BIOTECHNOLOGY Mini Orbital Shaker

---

Analysenwaagen	SARTORIUS Analytic SARTORIUS Universal
Thermocycler	BIOMETRA T3 Thermocycler BIORAD C1000 Thermal Cycler
Thermomixer	EPPENDORF Thermomixer 5436 EPPENDORF Thermomixer compact BIOMETRA Thermo shaker
Vortex-Gerät	SCIENTIFIC INDUSTRIES Vortex Genie 2 VWR Lab dancer VWR Vortexer OMNILAB MS1 Minishaker BENDER & HOBEIN Vortex Genie 2 HEIDOLPH Reax 2000
Wasseraufbereitungsanlage	MILLIPORE Milli-Q Advantage A10
Hybridisierungsöfen	TECHNE Hybridiser UVP HL-2000 HybriLinker (Kombigerät)
Crosslinker	STRATAGENE UV Stratalinker 2400 UVP HL-2000 HybriLinker (Kombigerät)
Elektroporationssystem	BIORAD Gene Pulser Xcell System LONZA Amaxa system INVITROGEN Neon system
Wasserheizbad	GFL 1002, 1003, 1004 HAAKE W26/DC5
Laborwippe	GRANT-BIO PMR-30
Chemilumineszenzkammer	VILBER LOURMAT Fusion-SL 3500-WL BIORAD Chemidoc xrs
Röntgenfilmentwicklung	AGFA Curix 60

---

Blot-Transfersystem	BIOMETRA Vacu-Blot system GIBCO Capillar Blot transfer system
N <sub>2</sub> -Lagerbehälter (-196 °C)	CRYO SYSTEMS CS 200B
Gefrierschrank (-70 °C)	HERAEUS Hera freeze HFU 486 TOP
Gefrierschrank (-20 °C)	LIEBHERR SS3365-10
Kühlschrank (+4 °C)	LIEBHERR Comfort

## **5.2. Materialien**

### **5.2.1. Transferfolien und Filterpapiere**

Sterilfiltration	SARTORIUS Membranfilter, Porengröße 0,45 µm und 0,2 µm WHATMAN Membranfilter, Porengröße 0,2 µm
Nylonmembran	GE HEALTHCARE Hybond N <sup>+</sup>
Blotting Papier	WHATMAN Gel Blotting Paper 3MM WHATMAN Chromatography Paper 3MM CHR

### **5.2.2. Chemikalien**

Es wurden Chemikalien der Firma Abbott Molecular, Bayer, New England Biolabs, Boehringer, Difco, Flow, Fluka, Gibco, GE Healthcare, Hoechst, Invitex, Lonza, Macherey-Nagel, Merck, Peqlab, Pharmacia, Promega, Qiagen, Roth, Serva, Sigma-Aldrich, Stratagene verwendet. Chemikalien für Southern Blot-Analysen wurden von GE Healthcare bezogen.

### **5.2.3. Enzyme**

Enzyme wurden von New England Biolabs, Invitrogen, Roche, Finnzyme, Qiagen, Bioline geliefert.

### **5.2.4. Zellkulturmaterial**

Das verwendete Plastik-Zellkulturmaterial zur Kultivierung und Passage der eukaryotischen Zellen stammte von den Firmen Beckton Dickinson, Corning Life Sciences, Eppendorf, Gibco, Greiner, Nunc, TPP und Watson

### 5.2.5. Antikörper

Die verwendeten Antikörper (primär/sekundär) stammten von Sigma-Aldrich und Pierce/Thermo Scientific.

### 5.2.6. Vektoren

#### pEPI-delCM18 (Broll, 2008)

*[FRT] - [eGFP] - [S/MAR M18] - [SV40 polyA] - [SV40 ori/Promotor] - [FRT] - [neo<sup>r</sup>/kan<sup>r</sup>]*

#### pEPI-antiHLC\_M18

Insertion einer SV40 polyA-Sequenz über die SalI/BamHI-Schnittstelle im Vektor pEPI-delCM18, Deletion der EGFP-Sequenz über die AgeI/BglII-Schnittstelle im Vektor pEPI-delCM18 und Insertion eines 767 bp-Fragmentes mit der IgG-LC-Sequenz über die AgeI/BglII-Schnittstelle

*[FRT]-[IgG-LC]-[SAR M18]-[SV40 polyA]- [SV40 Promotor/Enhancer/ori]-[FRT]-[neo<sup>r</sup>/kan<sup>r</sup>]-[pUC ori]*

#### pEPI-antiHHC\_M18

Insertion einer SV40 polyA-Sequenz über die SalI/BamHI-Schnittstelle im Vektor pEPI-delCM18, Deletion der EGFP-Sequenz über die AgeI/BglII-Schnittstelle und Insertion eines 1508 bp-Fragmentes mit der IgG-HC-Sequenz über die AgeI/BglII-Schnittstelle

*[FRT]-[IgG-HC]-[SAR M18]-[SV40 polyA]- [SV40 Promotor/Enhancer/ori]-[FRT]-[neo<sup>r</sup>/kan<sup>r</sup>]-[pUC ori]*

#### pEPI-eGFP\_M18\_antiHLC

Insertion einer SV40 polyA-Sequenz über die SalI/BamHI-Schnittstelle im Vektor pEPI-delCM18, Insertion eines 1580 bp-Fragment mit der IgG-LC-Expressionskassette über die BamHI-Schnittstelle

*[FRT]-[EGFP]-[SAR M18]-[SV40 polyA]-[SV40 Promotor]-[IgG-LC]-[SV40 polyA]-[SV40 Enhancer]-[SV40 Promotor/Enhancer/ori]-[FRT]-[neo<sup>r</sup>/kan<sup>r</sup>]-[pUC ori]*



**pEPI-eGFP\_M18\_antiHHC**

Insertion einer SV40 polyA-Sequenz über die SalI/BamHI-Schnittstelle im Vektor pEPI-delCM18, Insertion eines 2200 bp-Fragment mit der IgG-HC-Expressionskassette über die BamHI-Schnittstelle

*[FRT]-[EGFP]-[SAR M18]-[SV40 polyA]-[SV40 Promotor]-[IgG-HC]-[SV40 polyA]-[SV40 Enhancer]-[SV40 Promotor/Enhancer/ori]-[FRT]-[neo<sup>r</sup>/kana<sup>r</sup>]-[pUC ori]*

**pEPI-eGFP\_M18\_antiHHC\_UbC**

Deletion des SV40-Promotors strangaufwärts der IgG-HC-Sequenz über die Schnittstellen MluI/NruI im Vektor pEPI-eGFP\_M18\_antiHHC, Insertion eines 1240 bp-Fragmentes mit dem hUbC-Promotor über die MluI/NruI-Schnittstelle, Deletion eines 1108 bp-Fragment (F1 ori, SV40-Promotor, FRT-site) über die MluI/HindIII-Schnittstelle, Insertion eines 495 bp-Fragmentes mit dem SV40-Promotor, -Enhancer und einer FRT-site über die MluI/HindIII-Schnittstelle

*[FRT]-[EGFP]-[SAR M18]-[SV40 polyA]-[hUbC-Promotor]-[IgG-HC]-[SV40 polyA]-[SV40 Enhancer]-[SV40 Promotor/Enhancer/ori]-[FRT]-[neo<sup>r</sup>/kana<sup>r</sup>]-[pUC ori]*

**pEPI-antiHLC\_M18\_UbC**

Deletion eines SV40 Promotor/Enhancer/ori-Fragmentes über die MfeI/HindIII-Schnittstelle im Vektor pEPI-antiHLC\_M18, Insertion eines 62 bp-Fragmentes mit einer FRT-site über die MfeI/HindIII-Schnittstelle, Insertion eines 1254 bp-Fragmentes mit dem hUbC-Promotor über die MfeI-Schnittstelle

*[FRT]-[IgG-LC]-[SAR M18]-[SV40 polyA]-[hUbC Promotor]-[FRT] ]-[neo<sup>r</sup>/kana<sup>r</sup>]-[pUC ori]*

**pEPI-eGFP\_M18\_antiHHC\_delUTR**

Deletion eines 1420 bp-Fragmentes mit dem pUC ori und einer FRT-site über die BstBI/AgeI-Schnittstelle im Vektor pEPI-eGFP\_M18\_antiHHC, Insertion eines 1270 bp-Fragmentes mit einem pUC ori und einer FRT-site über die BstBI/AgeI-Schnittstelle, Deletion eines 1360 bp-Fragmentes (F1 ori, SV40 Promotor/Enhancer, FRT-site) über die BamHI/HindIII-Schnittstelle und Insertion eines 495 bp-Fragmentes mit dem SV40-Promotor/Enhancer und einer FRT-site über die BamHI/HindIII-Schnittstelle

*[FRT]-[EGFP]-[SAR M18]-[SV40 polyA]-[SV40 Promotor]-[IgG-HC]-[SV40 polyA]-[SV40 Enhancer]-[SV40 Promotor/Enhancer/ori]-[FRT]-[neo<sup>r</sup>/kana<sup>r</sup>]-[pUC ori]*

### **pEPI-antiHLC\_M18\_delUTR**

Deletion eines 1420 bp-Fragmentes mit dem pUC ori und einer FRT-*site* über die BstBI/AgeI-Schnittstelle im Vektor pEPI-antiHLC\_M18, Insertion eines 1270 bp-Fragmentes mit einem pUC ori und einer FRT-*site* über die BstBI/AgeI-Schnittstelle, Deletion eines 1360 bp-Fragmentes (F1 ori, SV40 Promotor/Enhancer, FRT-*site*) über die BamHI/HindIII-Schnittstelle und Insertion eines 495 bp-Fragmentes mit dem SV40-Promotor/Enhancer und einer FRT-*site* über die BamHI/HindIII-Schnittstelle

*[FRT]-[IgG-LC]-[SAR M18]-[SV40 polyA]- [SV40 Promotor/Enhancer/ori]-[FRT]-[neo<sup>r</sup>/kana<sup>r</sup>]-[pUC ori]*

### **pEPI-eGFP\_M18\_antiHHC\_UbC\_delUTR**

Deletion eines 1420 bp-Fragmentes mit dem pUC ori und einer FRT-*site* über die BstBI/AgeI-Schnittstelle im Vektor pEPI-eGFP\_M18\_antiHHC\_UbC, Insertion eines 1270 bp-Fragmentes mit einem pUC ori und einer FRT-*site* über die BstBI/AgeI-Schnittstelle

*[FRT]-[EGFP]-[SAR M18]-[SV40 polyA]-[hUbC-Promotor]-[IgG-HC]-[SV40 polyA]-[SV40 Enhancer]-[SV40 Promotor/Enhancer/ori]-[FRT]-[neo<sup>r</sup>/kana<sup>r</sup>]-[pUC ori]*

### **pEPI-antiHLC\_M18\_UbC\_delUTR**

Deletion eines 1420 bp-Fragmentes mit dem pUC ori und einer FRT-*site* über die BstBI/AgeI-Schnittstelle im Vektor pEPI-antiHLC\_M18\_UbC, Insertion eines 1270 bp-Fragmentes mit einem pUC ori und einer FRT-*site* über die BstBI/AgeI-Schnittstelle

*[FRT]-[IgG-LC]-[SAR M18]-[SV40 polyA]-[hUbC Promotor]-[FRT] ]-[neo<sup>r</sup>/kana<sup>r</sup>]-[pUC ori]*

### **pEPI-delCegfpamp2 (Broll, 2008)**

*[FRT] - [eGFP] – [ SAR E] - [SV40 polyA] - [SV40 ori/Promotor] - [FRT] -[neo<sup>r</sup>/kana<sup>r</sup>]-[cmv-Promotor]*

### **SV40GFPS/MAR-PF (PlasmidFactory)**

Basiert auf dem Vektor pEPI-delCM18

[SV40 ori/Promotor]-[eGFP]-[SAR M18]-[SV40 polyA]-[lacO]

### CSEG-gHpA-SV40P-Puro (Rentschler Biotechnologie, TEC PEX)

[CMV IE Promotor]-[SEAP]-[EMCV-IRES]-[EGFP]-BgH polyA-[FRT]-[SV40 Promotor]-[puro<sup>r</sup>]-[SV40 polyA]-[amp<sup>r</sup>]-[ColE1 ori]

#### 5.2.7. Oligonukleotide

Oligonukleotidsynthesen wurden von der Firma Eurofins MWG Operon durchgeführt. DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma GATC oder der Arbeitsgruppe Genomanalytik am HZI durchgeführt.

<i>pEpi-CM18HCS/MAR</i>	5'-GCATGCCATCATGACTTCAG-3'
<i>HLCM18FRTrev</i>	5'-CGAAACGATCCTCATCCTGT-3'
<i>pUCori_fw</i>	5'-AATGCAGAAACGGAGAGACA-3'
<i>pUCori_rev</i>	5'-TTCAGAAGACAGAAGCAGAGAGA-3'
<i>EPIGFPM18LC/HCfw</i>	5'-ATCGAGCTGAAGGGCATCGACT-3'
<i>EPIGFPM18LC/HCrev</i>	5'-CCGGTGGTGCAGATGAACTTCA-3'
<i>SV40GFP2_fw</i>	5'-ACCTTAATGCGCCTCGCGCT-3'
<i>SV40GFP2_rev</i>	5'-ATGCCGGCTAGACTAGGCCCA-3'
<i>FRTMfeBamHHindfw</i>	5'-TTTAAAGCTTGAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCT CTAGAAAGTATAGGAACTTCGGATCCCAATTGTTTT-3'
<i>FRTMfeBamHHindre</i>	5'-AAAACAATTGGGATCCGAAGTTCCTATACTTTCTAGA GAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTTCAAGCTTAAAA-3'
<i>UbC_MluI_sense</i>	5'-AAAAACGCGTAACGAGACTAGCCTCGACGCGT-3'
<i>UbC_NruI_asense</i>	5'-AAAATCGCGACGAAGTTATGGATCCGCTAGCG-3'
<i>UbC_MfeI_sense</i>	5'-AAAACAATTGAACGAGACTAGCCTCGACGCGT-3'
<i>UbC_MfeI_asense</i>	5'-AAAACAATTGCGAAGTTATGGATCCGCTAGCG-3'
<i>SV40FRTMfeIfw</i>	5'-AAAACAATTGGGAAAGAACCAGCTGTGGAA-3'
<i>SV40FRTHindIIIrev</i>	5'-AAAAAAGCTT ATTCAGTGGCCGTCGTTTTTA-3'
<i>pS-HLC-LCAgeI</i>	5'-AAAAACCGGTAAATGATCCAGCCACCATGG-3'
<i>pS-HLC-LCBamHI</i>	5'-AAAAGGATCCGCCCCGACTCTAGCATTTAA-3'

<i>pS-HHC-HCAgeI</i>	5'-AAAAACCGGTTTCGTTTAAACGATCCAGCCACC-3'
<i>pS-HHC-HCBamHI</i>	5'-AAAAGGATCCTCATGTCTGCTCGAAGCGGC-3'
<i>pS-HLC-SVLCEnhfw</i>	5'-AAAAGGATCCCGAGATCTGCGATCTGCATC-3'
<i>pS-HLC-SVLCEnhre</i>	5'-AAAAGGATCCAGTGCGGCGACGATAGTCAT-3'
<i>pS-HHC-SVHCEnhfw</i>	5'-AAAAGGATCCCGAGATCTGCGATCTGCATC-3'
<i>pS-HHC-SVHCEnhre</i>	5'-AAAAGGATCCCCGCTGTGGAATGTGTGTCA-3'

### 5.2.8. Computerprogramme

Die Texte, Grafiken und Tabellen in dieser Arbeit wurden mit den Programmen Word 2007, Powerpoint 2007 und Excel 2007 der Firma Microsoft erstellt. Die Bearbeitung von Bilddateien erfolgte mit dem Programm GIMP 2.6.11 (open source, GPL). Zur Durchführung von Sequenzanalysen und zur Restriktionskartierung wurden die Programme Vektor NTI 6.0 (Invitrogen), QuickGene (Crimson Base), Clone Manager (Sci-Ed software) und BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) verwendet. Die Auswertung der Gelelektrophorese erfolgte mit den Programmen MegaCapt und Bio 1D (Vilber Lourmat). Die Dokumentation der Chemilumineszenz-Signale im Southern Blot wurde mit dem Programm Fusion (Vilber Lourmat) durchgeführt. Die Auswertung von FACS-Analysen erfolgte mit CellQuest Pro (BD) und FlowJo (Version 7.6.4., FlowJo). Die Suche nach Polyadenylierungssignalen erfolgte mit polyadq (Tabaska et al., 1999; [http://rulai.cshl.org/tools/polyadq/polyadq\\_form.html](http://rulai.cshl.org/tools/polyadq/polyadq_form.html)). SIDD-Profilen wurden erstellt mit webSIDD (Benham et al., 2004; <http://genomics.ucdavis.edu/benham/sidd/index.php>). Zur DNA-Kopienzahlberechnung und sonstigen molekularbiologischen Berechnungen wurde das Programm EndMemo (<http://www.endmemo.com/bio/dnacopynum.php>) verwendet.

### 5.2.9. Verwendete Formeln

IgG-Produktivität der Zellen  $\text{pg}_{\text{Produkt}} \times (\text{Zellzahl})^{-1} \times (\text{Kulturdauer in Tagen})^{-1}$

Standardabweichung  $\sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$

### 5.3. Allgemeine Grundtechniken

#### 5.3.1. Sterilisieren

Glasgeräte wurden vor Gebrauch 4 h bei 180°C hitzesterilisiert. Alle Lösungen wurden entweder mit einem 0,22 µm Filter sterilfiltriert oder 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck im Wasserdampf autoklaviert.

#### 5.3.2. Fällung von Nukleinsäuren

Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte durch Zugabe von einem einfach geladenen Salz und Alkohol. Als Salz diente entweder eine 3 mol L<sup>-1</sup> Natriumacetat-Lösung (pH 4,8 – 5,2), von der 0,1 Volumen zur Nukleinsäurelösung gegeben wurde oder Lithiumchlorid in einer Endkonzentration von 0,8 mol L<sup>-1</sup>. Als Alkohol wurden 2 Volumen 100% Ethanol oder 0,6 Volumen Isopropanol zur Nukleinsäurelösung gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei RT erfolgte die Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 16.000x – 17.000x g. Die Nukleinsäuren wurden daraufhin zum Entsalzen zweimal mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen (incl. jeweils Zentrifugation für 1 min bei 16.000x – 17.000x g). Anschließend wurde das Pellet 10-20 min bei RT getrocknet und in 1x TE-Puffer gelöst.

#### 5.3.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD<sub>260</sub>). Weiterhin wurde zur Bestimmung der Reinheit der DNA das Verhältnis  $\frac{OD_{260}}{OD_{280}}$  und  $\frac{OD_{260}}{OD_{230}}$  gebildet. Das Verhältnis  $\frac{OD_{260}}{OD_{280}}$  sollte 1,8-2,0 betragen. Abweichungen von diesem Wert deuten auf eine Kontamination mit z.B. Protein oder RNA hin. Das Verhältnis  $\frac{OD_{260}}{OD_{230}}$  sollte bei 2,0-2,2 liegen. Niedrigere Werte zeigen Kontaminationen mit z.B. EDTA oder Kohlenhydraten.

### 5.4. Arbeiten mit *Escherichia coli* (*E. coli*)

#### 5.4.1. Verwendete *E. coli*-Stämme

XL1 Blue MRF<sup>c</sup>      *recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac* [*F'* *proAB, lacI<sup>f</sup>ZAM15, Tn10 (Tet<sup>r</sup>)*] (STRATAGENE)

EL250      *F' mcrA Δ(mrr–hsdRMS–mcrBC) Φ80dlacZAM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara,leu)7649 galU galK rspL nupG [λcl857 (cro–bioA)<>araC–P<sub>BAD</sub>flpe]* (Lee et al., 2000; Quelle: MH Hannover)

MM294-FLP [F-  $\lambda$ - *supE44 endA1 thi-1 hsdR17 lacZ::cI857-FLP*], (Buchholz F. et al., 1996, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Stewart, A.F., TU Dresden)

#### 5.4.2. Verwendete Kulturmedien für Bakterien

LB-Nährmedium	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 5 g NaCl mit bidestilliertem H <sub>2</sub> O auf 1000 mL auffüllen, mit NaOH auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren
TB-Nährmedium	12 g Bacto-Trypton 24 g Bacto-Hefeextrakt 4 mL Glycerin mit H <sub>2</sub> O auf 900 mL auffüllen und autoklavieren. Vor Gebrauch wird 100 mL einer sterilfiltrierten KHPO <sub>4</sub> -Lösung (0,17 mol L <sup>-1</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /0,72 mol L <sup>-1</sup> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) zugegeben.
5x M9-Salzlösung	64 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 15 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2.5 g NaCl 5 g NH <sub>4</sub> Cl mit bidest. H <sub>2</sub> O auf 1000 mL auffüllen und autoklavieren
M9-Minimalmedium	200 mL 5x M9-Salzlösung 2 mL sterilfiltrierte 1 mol L <sup>-1</sup> MgSO <sub>4</sub> -Lösung 0,1 mL sterilfiltrierte 1 mol L <sup>-1</sup> CaCl <sub>2</sub> -Lösung auf 1000 mL mit sterilem bidest. H <sub>2</sub> O auffüllen

#### 5.4.3. Kultivierung von *E. coli*

Es wurde etwas Kultur von einem Glycerinstock oder einer Kolonie auf einer Agarplatte mit einer 20-200µL-Pipettenspitze abgenommen und in einen Erlenmeyerkolben mit dem gewünschten Volumen Kanamycin-LB-Medium (25 µg mL<sup>-1</sup> Kanamycin) transferiert. Die Kultivierung erfolgte auf einem Schüttler über Nacht bei 180 Upm (Erlenmeyerkolben mit Schikanen) oder 300 Upm (Erlenmeyerkolben ohne Schikanen) und 30-37 °C.

#### 5.4.4. Herstellung von Agarplatten

Dem LB-Medium wurden  $15 \text{ g L}^{-1}$  Agar zugegeben und autoklaviert. Zur Herstellung kanamycinhaltiger Agarplatten wurde zum noch warmen LB-Agar-Medium  $\frac{1}{2000}$  Volumen Kanamycin einer steriltfiltrierten Stammlösung ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$  in  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  Endkonzentration) zugegeben. Die Agarplatten wurden anschließend in entsprechende Rundschalen gegossen. Die Lagerung der Agarplatten erfolgte nach dem Erstarren des LB-Agars bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 5.4.5. Elektrotransformation von kompetenten Zellen

Bei der Elektroporation wird die Zellmembran in einem elektrischen Feld permeabilisiert. Fremd-DNA kann dadurch in das Zellinnere aufgenommen werden. Die Transformationsrate ( $10^9$ - $10^{10}$  Transformanten/ $\mu\text{g}_{\text{DNA}}$ ) ist im Vergleich mit der Calciumchlorid-Methode ( $10^7$ - $10^8$  Transformanten/ $\mu\text{g}_{\text{DNA}}$ ) höher.  $15 \text{ } \mu\text{L}$  eines  $30 \text{ } \mu\text{L}$ -Ligationsansatzes bzw.  $10 \text{ ng}$  DNA wurden mit  $5 \text{ } \mu\text{L}$  elektrokompenten *E. coli*-Zellen und  $\text{H}_2\text{O}$  auf Eis gemischt (Gesamtvolumen =  $35 \text{ } \mu\text{L}$ ). Der Ansatz wurde in eine sterile  $0,1 \text{ cm}$ -Elektroporationsküvette gefüllt. Die Elektroporation erfolgte anschließend bei  $1,7 \text{ kV}$ ,  $200 \text{ } \Omega$  und  $25 \text{ } \mu\text{F}$ . Die Zeitkonstante sollte  $4$ - $5 \text{ ms}$  betragen, die elektrische Feldstärke beträgt dann  $12,5 \text{ kV cm}^{-1}$ . Danach wurde sofort  $1 \text{ mL}$  vorgewärmtes SOC-Medium in die Küvette gegeben, gut gemischt und anschließend das gesamte Volumen in ein  $2 \text{ mL}$ -Reaktionsgefäß überführt. Der Ansatz wurde  $1 \text{ h}$  bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  bei  $600 \text{ Upm}$  im Thermoblock inkubiert und daraufhin verschiedene Volumina des Ansatzes ( $2,5$ - $100 \text{ } \mu\text{L}$ ) auf Kanamycin-LB-Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  im Brutschrank inkubiert.

#### 5.4.6. Selektion von Einzelklonen nach der Plasmid-Klonierung und Transformation in *E. coli*

Nach der Klonierung und der Elektrotransformation des gewünschten Plasmids in *E. coli*, sollen die entstandenen *E. coli*-Kolonien auf das jeweilige Plasmid hin untersucht werden. Dazu wurden zwei Methoden verwendet:

A)  $5$ - $20$  Kolonien wurden jeweils in  $2 \text{ mL}$  frisches Kanamycin-LB-Kulturmedium ( $25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  Kanamycin) mit einem sterilen Zahnstocher oder einer  $20$ - $200 \text{ } \mu\text{L}$  Pipettenspitze transferiert und über Nacht bei  $300 \text{ Upm}$  und  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  kultiviert. Anschließend wurde von jeder Kultur die Plasmid-DNA gemäß 5.5.1.1. oder 5.5.1.2. präpariert. Die präparierte Plasmid-DNA wurde nun durch Restriktion mit anschließender Gelelektrophorese charakterisiert bzw. auf ihre

Länge hin untersucht. Im Anschluss wurde die Plasmid-DNA eines Klons mit potentiell, korrekter Plasmid-DNA sequenziert.

B) 5-20 Kolonien wurden jeweils mit einem sterilen Zahnstocher oder einer 20-200 µL Pipettenspitze in einen vorbereiteten PCR-Ansatz transferiert. Die PCR wurde dann gemäß 5.7.1. durchgeführt. Im Anschluss wurden die PCR-Amplifikate in einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Durch die Wahl des Primerpaares kann festgestellt werden, ob das Plasmid korrekt in dem Einzelklon vorliegt. Die Plasmid-DNA eines Klons mit potentiell, korrekter Plasmid-DNA wurde dann sequenziert.

#### **5.4.7. Konservierung von Bakterienkolonien**

Glycerinlösung      65 % (v/v) Glycerin  
                             0,1 mol L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>  
                             25,0 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8

Für eine Lagerung von 2-3 Wochen wurde eine frische Kultur auf Kanamycin-LB-Agarplatten (25 µg mL<sup>-1</sup> Kanamycin) ausgestrichen und über Nacht, bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Agarplatten mit Parafilm (Pechiney Plastic Packaging Inc.) verschlossen und bei 4 °C gelagert. Für eine Langzeitlagerung wurde 1 mL einer frischen Kultur mit 1 mL Glycerinlösung versetzt und in einem 2-mL-Einfrierröhrchen bei -70 °C gelagert („Glycerinstock“).

#### **5.5. Isolierung von Nukleinsäuren**

##### **5.5.1. Isolierung aus prokaryontischen Zellen**

##### **5.5.1.1. Plasmidisolierung im analytischen Maßstab mit der „Boiling Prep“-Methode**

TER                              10 µg RNase A auf 1 mL TE  
   Lagerung bei RT

Mit dieser Methode wurde Plasmid-DNA aus allen verwendeten Bakterienstämme präpariert. Die Durchführung und die Herstellung der verwendeten Puffer erfolgte nach Sambrook & Russell <sup>[287]</sup>. 2 mL Kanamycin-LB/TB-Nährmedium (25 µg mL<sup>-1</sup> Kanamycin) wurde mit etwas *E. coli*-Kultur angeimpft. Dazu wurde mit einer sterilen 20-200 µL-Pipettenspitze etwas Kultur vom Glycerinstock oder einer Agarplatte entnommen und in das Kulturröhrchen gegeben. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C und 300 Upm inkubiert. Die gesamte



Kultur wurde dann in ein 2 mL Reaktionsgefäß gefüllt und bei 2500x g für 1 min zentrifugiert. Die Plasmidisolierung wurde gemäß Anleitung <sup>[287]</sup> durchgeführt. Das Pellet wurde in 50 µL TER aufgenommen.

#### **5.5.1.2. Plasmidpräparation mit kommerziellen Aufreinigungspacketen der Firma QIAGEN**

Die Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde mit kommerziell erhältlichen Aufreinigungspacketen der Firma QIAGEN durchgeführt. Die Aufreinigung basiert dabei auf der Wechselwirkung zwischen dem negativ geladenen Phosphat der DNA und positiv geladenen DEAE-Gruppen des Säulenmaterials in einer Anionenaustauschersäule. Es wurden 2 mL („Mini“), 50 mL („Midi“) und 150 mL („Maxi“) *E. coli*-Übernachtskultur mit den jeweiligen Säulen gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Die zu präparierenden Bakterienklone wurden im jeweiligen Volumen Kanamycin-LB/TB-Medium (25 µg mL<sup>-1</sup> Kanamycin) bei 300 Upm und 37 °C in einer Schüttelkultur über Nacht inkubiert. Die Kultur wurde anschließend bei 2500x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Plasmid-DNA gemäß Herstellerangaben aus den Zellen präpariert.

#### **5.5.2. Isolierung aus eukaryotischen Zellen**

##### **5.5.2.1. Präparation von hochmolekularer DNA mit dem kommerziellen Aufreinigungs-packet „DNeasy Blood & Tissue Kit“ der Firma QIAGEN**

Proteinase K (600 mAU/mL)

RNase A (100 mg/mL)

1x PBS	0,2 g KCl
	0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	1,15 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	8 g NaCl
	Die Lösung auf 1000 mL mit H <sub>2</sub> O auffüllen, pH 7,4

Für eine Säule des Aufreinigungspaketes wurden 5×10<sup>6</sup> Zellen aufgeschlossen. Die Aufreinigung der Gesamt-DNA der Zellen mit dieser Methode basiert auf der Wechselwirkung zwischen dem negativ geladenen Phosphat der DNA und positiv geladenen DEAE-Gruppen des Säulenmaterials in einer Anionenaustauschersäule. Die Zellen wurden

bei 300x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA gemäß Herstellerangaben aus den Zellen isoliert.

#### 5.5.2.2. Isolierung von hochmolekularer DNA nach Ramirez-Solis et al. (1995) <sup>[288]</sup>

„Modified-Bradley“-Puffer	10 mmol L <sup>-1</sup> Tris/HCl, pH 7,5
	2 mmol L <sup>-1</sup> EDTA
	10 mmol L <sup>-1</sup> NaCl
	0,5 % Natriumlaurylsulfat
	1 mg mL <sup>-1</sup> Proteinase K

5×10<sup>6</sup> Zellen wurden bei 300x g zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit 1 mL PBS gewaschen und schließlich in 400 µL „Modified Bradley“-Puffer resuspendiert. Der Ansatz wurde über Nacht bei 55 °C inkubiert. Durch Zugabe von 880 µL 100 % EtOH und 40 µL 3 mol L<sup>-1</sup> NaAcetat wurde die DNA anschließend für 2 h bei RT gefällt. Der Ansatz wurde 5 min bei 2500x g für 5 min zentrifugiert, Das Pellet mit 500 µL 70% EtOH zweimal gewaschen und jeweils bei 2500x g zentrifugiert. Das Pellet wurde schließlich bei RT getrocknet und in 100 µL TE-Puffer oder H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 5.6. DNA-Modifizierung

#### 5.6.1. Restriktion von DNA mit Restriktionsendonucleasen

Für Klonierung der DNA oder Herstellung von DNA-Sonden wurden unterschiedliche Restriktionsendonucleasen (RE) in den entsprechenden Puffern von New England Biolabs verwendet. Die Restriktionsendonucleasen wurden jeweils in einer Konzentration von 1-4  $\frac{\text{Units}}{\mu\text{g}_{\text{DNA}}}$  unter den vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde bei hochmolekularer DNA immer über Nacht bei der entsprechenden Temperatur (meist 37 °C) inkubiert, bei niedermolekularer DNA wurde je 1 µg<sub>DNA</sub> mit 1 Unit<sub>Enzym</sub> für 1 h inkubiert. Bei niedermolekularer bzw. hochmolekularer DNA muss darauf geachtet werden, dass die verwendeten Restriktionsendonucleasen nicht durch dam/dcm- bzw. CpG-Methylierung inhibiert werden.

### 5.6.2. Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden

Puffer 2	50 mmol L <sup>-1</sup> NaCl 10 mmol L <sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 7,9 10 mmol L <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub> 1 mmol L <sup>-1</sup> DTT
dNTP-Mix	dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 3 mmol L <sup>-1</sup> in Wasser

Zum Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden, die durch verschiedene Restriktionsendonucleasen entstehen, wurde das Klenow-Fragment verwendet. Dieses ist ein proteolytisches Produkt der DNA-Polymerase I, welches die Polymeraseaktivität behalten, jedoch die 5'-3'- und 3'-5'-Exonucleaseaktivität verloren hat. Es entstehen glatte DNA-Enden, die zur Ligation von vorher nicht komplementären DNA-Enden verwendet werden können. In einem Reaktionsansatz von 30 µL wurden bis zu 1 µg gespaltene DNA mit 4 µL dNTP-Mix und 1-2 Units des Klenow-Fragments in Puffer 2 bei 37 °C für 30 min inkubiert.

### 5.6.3 Dephosphorylierung der 5'- bzw. 3'-DNA-Enden

Reaktionspuffer (SAP)	10 mmol L <sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 7.5 100 mmol L <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub> 0,1 mg mL <sup>-1</sup> BSA.
Reaktionspuffer (CIP)	50 mmol L <sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 7.9 100 mmol L <sup>-1</sup> NaCl 10 mmol L <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub> 0,1 mmol L <sup>-1</sup> DTT

Zur Verminderung von Religationen von Vektorfragmenten bei Ligationsreaktionen wurden die 5'- bzw. 3'-DNA-Enden der entsprechenden Fragmente direkt nach Restriktionsspaltung mit einer alkalischen Phosphatase im entsprechenden Puffer dephosphoryliert. Es wurde entweder „*shrimp alkaline phosphatase*“ (SAP) oder „*calf intestinal phosphatase*“ (CIP) verwendet. Eine Unit des Enzyms hydrolysiert 1 µmol 4-Nitrophenylphosphat in 1 min bei 37 °C. Das Enzym wurde bei 65 °C für 10 min inaktiviert.

#### 5.6.4 Ligation von DNA-Fragmenten zur Klonierung von Vektoren

T4-Ligasepuffer	50 mmol L <sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 7,5
	10 mmol L <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub>
	10 mmol L <sup>-1</sup> DTT
	1 mmol L <sup>-1</sup> ATP

Mithilfe der T4-Ligase werden zwei DNA-Enden unter Bildung einer Phosphodiesterbindung verknüpft. Dabei können kompatible überhängende und glatte Enden miteinander verknüpft werden. Es wurden jeweils 100 ng gespaltener, dephosphorylierter Vektor eingesetzt. Das DNA-Fragment („*Insert*“) wurde in einem molaren Verhältnis von Vektor:Insert = 1:3 – 1:5 eingesetzt. Der Reaktionsansatz (mit 800 Units<sub>T4-Ligase</sub>) wurde im T4-Ligasepuffer für 2 h bei RT oder über Nacht bei 16 °C inkubiert. Das Enzym wurde nach der Reaktion bei 65 °C für 10 min inaktiviert.

#### 5.7. Charakterisierung von Nukleinsäuren

##### 5.7.1. Standard-Polymerasekettenreaktion („*polymerase chain reaction*“; PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine etablierte Methode <sup>[289]</sup>, mit der, in einer sich wiederholenden Reaktion, kleinste Mengen eines bestimmten DNA-Abschnitts („*Template*“) in vitro millionenfach vervielfältigt werden können. Als *Template* dienen dabei z.B. Plasmide, genomische DNA oder cDNA-Präparationen. Um eine PCR durchzuführen, müssen zwei 15-30 bp lange Oligonukleotide („*Primer*“) vorhanden sein, die die gesuchte DNA-Sequenz gegenläufig flankieren, d.h. auf unterschiedlichen Strängen der Ziel-DNA binden.

Für Amplifikate bis 4000 bp wurde die RedTaq<sup>TM</sup> DNA Polymerase (SIGMA-ALDRICH), Bio-Mix<sup>TM</sup> (BIOLINE) oder die HotStartTaq<sup>TM</sup> DNA Polymerase (QIAGEN) verwendet. Dabei handelt es sich jeweils um eine Taq-Polymerase ohne Korrekturaktivität. Für längere Amplifikate und Amplifikate zur Plasmid-Klonierung wurde das Expand Long Template PCR System<sup>TM</sup> (ROCHE), bestehend aus einer Taq-Polymerase und einer Tgo-Polymerase mit Korrekturaktivität, die Phusion<sup>TM</sup> High Fidelity DNA Polymerase („Chimäre“ aus einer Pyrococcus-ähnlichen Polymerase und einer zusätzlich eingefügten dsDNA-bindenden Proteindomäne; New England Biolabs) oder die Phire<sup>TM</sup> DNA Polymerase (Taq-Polymerase mit zusätzlich eingefügter dsDNA-bindenden Proteindomäne; New England Biolabs) verwendet.

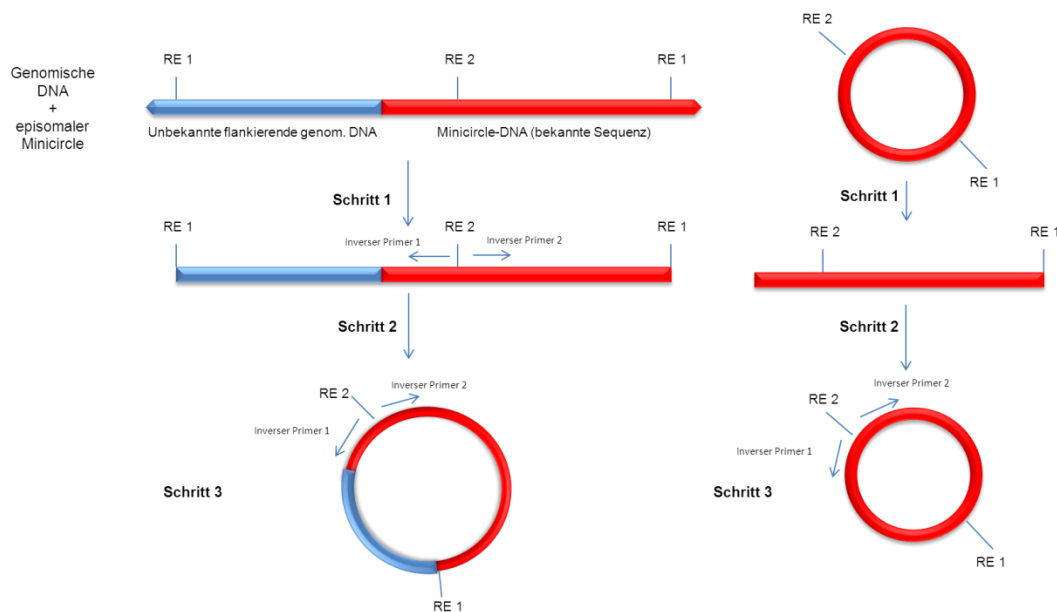
Das Temperaturprofil ist abhängig von der verwendeten DNA-Polymerase und der zu amplifizierenden DNA (s. Tabelle 22).

**Tabelle 22: Temperaturprofil der Standard-Polymerasekettenreaktion**

Vorgang	Temperatur	Zeit	Wiederholung
Initiale Denaturierung	94-98 °C	300 s	---
Denaturierung	94-98 °C	5-30 s	25-35×
Anlagerung der Primer	55-68 °C	5-60 s	
Elongation	68-72 °C	20-60 $\frac{s}{kbp_{Amplifikat}}$	
Finale Elongation	68-72 °C	60-600 s	---

### 5.7.2. Inverse PCR

Die Inverse PCR wird zur Bestimmung von eventuellen Integrationen von Minicircle-DNA in die genomische DNA verwendet.



**Abbildung 61: Prinzip der Inversen PCR**

Schritt 1: Die zelluläre DNA wird mit einer Restriktionsendonuclease (RE 1), die eine Erkennungsstelle im Minicircle besitzt, fragmentiert. Dabei wird der episomale Minicircle ebenfalls linearisiert. Schritt 2: Die linearisierte DNA wird unter Bedingungen, die die Selbstligation begünstigen, d.h. in einem großen Volumen, ligiert. Schritt 3: Unter Verwendung von zwei inversen Primern wird der religierte Minicircle oder das entstandene Mischplasmid aus genomischer und Minicircle-DNA amplifiziert. Die unterschiedlichen Amplifikate können anschließend sequenziert werden, um die Identität bzw. den Integrationsort zu bestimmen. Bei der Ligation entstehende, ungewollte Konkatemere können ebenfalls durch eine

Sequenzierung identifiziert werden. Die Restriktion mit einem weiteren Restriktionsenzym (RE 2) soll die Effizienz der Inversen PCR erhöhen bzw. entfernt Konkatemere und kann optional vor der Inversen PCR durchgeführt werden.

Im ersten Schritt wird die Gesamt-DNA des zu untersuchenden Einzelklons mit einem geeigneten Restriktionsenzym fragmentiert. Die erhaltenen DNA-Fragmente werden dann unter Bedingungen ligiert, die die Selbstligation begünstigen. Durch Einsatz der inversen Primer kann nun der erhaltene DNA-*circle*, bestehend aus Minicircle-DNA und genomischer DNA, mittels PCR amplifiziert werden.

Um den jeweiligen Einzelklon auf Integrationen der Minicircle-DNA zu untersuchen, wurden 3 µg der Gesamt-DNA, bestehend aus der genomischen DNA und der episomalen Minicircle-DNA, einer CHO-K1-Einzelklonpopulation in einem Restriktionsansatz mit SpeI oder XmnI (60 Units) über Nacht bei 37 °C fragmentiert. Anschließend wurde der Ansatz mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ von QIAGEN gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Danach wurde die fragmentierte DNA mit einer T4-Ligase (800 Units) in einem Gesamtvolumen von 500 µL für 2 h bei RT religiert. Der Ansatz wurde erneut mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ von QIAGEN gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Mit 100 ng religierter DNA wurde dann eine PCR, die sog. *full-length* PCR, über die gesamte Länge der DNA-*circles* durchgeführt. Dazu wurden jeweils zwei gegenläufige Primer gewählt, deren Erkennungssequenzen auf den DNA- *circles* dicht beieinander liegen, sodass bei einer PCR nahezu der gesamte DNA-*circle* amplifiziert wird (Abbildung 61, Schritt 3). Es wurde dazu die Phusion<sup>TM</sup> High Fidelity DNA Polymerase (NewEnglandBiolabs) oder die Phire<sup>TM</sup> DNA Polymerase (New England Biolabs) gemäß Herstellerangaben verwendet. Das verwendete Temperaturprofil ist in Tabelle 23 dargestellt. Die Elongationszeit war für die Amplifikation von 15 kbp (Elongationsrate laut Hersteller: 1 kbp in 20 s) ausgelegt.

**Tabelle 23: Temperaturprofil der Inversen PCR**

Vorgang	Temperatur	Zeit	Wiederholung
Initiale Denaturierung	95,0 °C	300 s	---
Denaturierung	95,0 °C	5 s	30x
Anlagerung der Primer	60,2 °C	5 s	
Elongation	72,0 °C	5 min	
Finale Elongation	72,0 °C	10 min	---

### 5.7.3. Southern Blot

Probenpuffer	0,25 % (w/v) Bromphenolblau
	0,25 % (w/v) Xylencyanol
	30 % (v/v) Glycerin

Es wurde das AlkPhos Direct Labelling and Detection System mit CDP-Star<sup>TM</sup> von GE Healthcare verwendet. Die Puffer wurden nach Herstellerangabe verwendet bzw. hergestellt. Mit dem von E.M. Southern (Southern, 1975) entwickelten Verfahren werden DNA-Fragmente, die zuvor mittels Gelelektrophorese gemäß ihrer Länge aufgetrennt wurden, auf einer Membran fixiert. Anschließend können durch Hybridisierung mit markierten Sonden einzelne DNA-Fragmente spezifisch nachgewiesen werden.

10 µg der aufgereinigten, hochmolekularen DNA wurden in einem Gesamtansatz von 30 µL mit einem Restriktionsenzym (20 Units), welches unempfindlich gegenüber DNA-Methylierung ist, im jeweiligen Reaktionspuffer über Nacht bei der spezifischen Temperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 6 µL Probenpuffer versetzt und elektrophoretisch in einem TAE-Agarosegel (0,8%) für 2-3 h aufgetrennt. Die Depurinierung und die Denaturierung der DNA, sowie die Neutralisation der Reaktion, wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Der Transfer der DNA vom Gel auf die positiv geladene Nylonmembran erfolgte mit Hochsalzpuffer (20x SSC) über Nacht mit einem Transferstapel unter Ausnutzung der Kapillarkräfte oder einem Vakuumblotter für 2 h. Nach dem Blot wurde die DNA kovalent an die Nylonmembran durch UV-Bestrahlung ( $2400 \mu\text{Joules}/\text{cm}^2$   $\frac{\mu\text{Joules}}{\text{cm}^2} \times 100$ ; „cross-linking“) gebunden. Es wurde je 100 ng Sonde gemäß Herstellerprotokoll mit alkalischer Phosphatase markiert. Die Nylonmembran wurde in eine Hybridisierungsröhre mit vorgewärmtem Hybridisierungspuffer transferiert und für 15 min bei 63-65 °C bei 8 Upm im Hybridisierungsofen inkubiert (Prähybrisierung). Anschließend wurde die Sonde zur Membran in die Hybridisierungsröhre gegeben und über Nacht bei 63-65 °C bei 8 Upm im Hybridisierungsofen inkubiert (Hybridisierung). Anschließend wurde die Membran für 2×10 min in Waschpuffer 1 bei 63-65 °C und 2x für 2×5 min in Waschpuffer 2 bei RT inkubiert. Die Membran wurde dann mit dem Substrat CDP-Star<sup>TM</sup> für 4 min bei RT überschichtet. Die Aufnahme der Chemilumineszenz der gebundenen Sonde erfolgte anschließend in der Chemilumineszenzkammer.

#### 5.7.4. Agarose-Gelelektrophorese

DNA- und RNA-Moleküle sind stark ionisiert, da die Phosphatgruppe von jedem Nukleotid eine negative Ladung zur Gesamtladung beiträgt. Deshalb wandern DNA- und RNA-Moleküle während der Gelelektrophorese zur positiv geladenen Elektrode. Kleinere Moleküle können im Vergleich zu größeren Nukleinsäuremolekülen die Agarosegelmatrix schneller durchwandern, so dass sich unterschiedlich große Moleküle voneinander trennen lassen.<sup>[290]</sup>

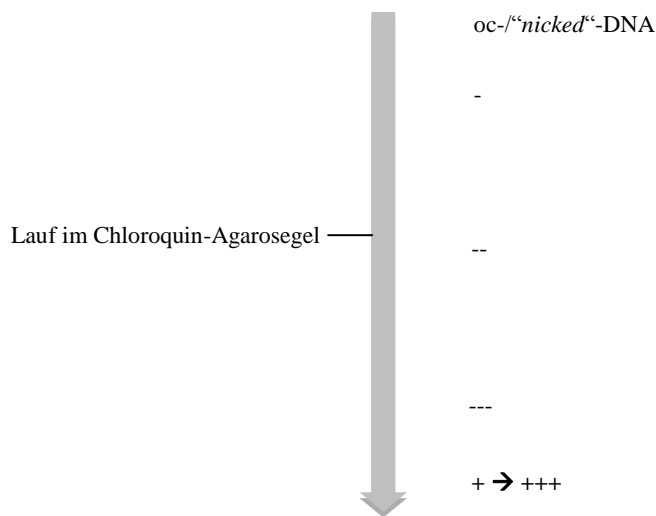
Die Agarose-Gelelektrophorese wurde gemäß Sambrook & Russell <sup>[287]</sup> in TAE-Puffer durchgeführt. Zur Bestimmung der Größe der DNA-Fragmente wurde neben den DNA-Proben ein Größenstandard aufgetragen. Anschließend wurde die Auftrennung unter UV-Licht (312-365 nm) dokumentiert. Zur präparativen Gewinnung von DNA-Fragmenten wurden die Banden aus dem Gel ausgeschnitten und mit einem kommerziell erhältlichen DNA-Aufreinigungspacket („QIAquick Gel Extraction Kit“) von der Firma QIAGEN aufgereinigt.

#### 5.7.5. Chloroquin-Agarose-Gelelektrophorese

Chloroquin-Stocklösung ( $25 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ )	25 mg Chloroquin-Diphosphatsalz
	1 mL MilliQ-H <sub>2</sub> O

Chloroquin ist ein planarer Stoff, der sich in der Doppelhelix zwischen benachbarte Basenpaare schieben kann, es interkaliert also in die DNA, dadurch kommt es zur Entwindung der DNA. Der Grad des negativen „supercoiling“ der DNA sinkt dadurch. In vitro bewirkt also die Interkalation eine Senkung der Anzahl an Helixdrehungen  $Tw$  (*twist*). Es kommt somit zur Relaxation der negativen supercoils der DNA  $Wr$  (*writhe*). Durch die genannten Eigenschaften des Chloroquins kann mithilfe eines Chloroquin-Agarosegels die Verteilung von DNA Topoisomeren untersucht werden.





**Abbildung 62: Einfluss von Chloroquin auf das Laufverhalten von ccc-DNA**

Durch Chloroquin im Gel werden negative Superhelices aus der ccc-DNA entfernt. Stark-negativ verdrillte ccc-DNA läuft in einem Chloroquin-Agarosegel schneller, als schwach-negativ verdrillte DNA. Positiv-verdrillte ccc-DNA läuft in einem Chloroquin-Agarosegel unabhängig von der Anzahl der Superhelices als eine Bande vor allen anderen Topoisomerformen, oc-/“nicked“-DNA läuft dagegen am langsamsten von allen Topoisomerformen.

Die folgenden Angaben beziehen sich auf eine Gelelektrophorese mit einem 150 mL Chloroquin-Agarosegel. Zunächst wurde 1,2 g Agarose in 150 mL TAE-Puffer aufgekocht und auf 50-55 °C abgekühlt. Es wurde das in Tabelle 24 angegebene Volumen an Chloroquin-Stocklösung zur warmen, flüssigen Agarose gegeben.

**Tabelle 24: Einstellen der gewünschten Chloroquin-Konzentration eines 150 mL-Agarosegels**

Konzentration	Chloroquin-Stocklösung ( $25 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ ) auf 150 mL flüssige Agarose
$2,5 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$	15 $\mu\text{L}$
$7,5 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$	45 $\mu\text{L}$
$15,0 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$	90 $\mu\text{L}$
$25,0 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$	150 $\mu\text{L}$

Dann wurde die flüssige Chloroquin-Agarose in einen Gelschlitten mit Kamm gegossen. Nachdem das Gel erstarrt war, wurde der Kamm entfernt und der Gelschlitten mit dem Chloroquin-Agarosegel in die Elektrophoresekammer transferiert. Die Kammer wurde mit Chloroquin-TAE-Puffer (Tabelle 25) gefüllt, so dass das Gel bedeckt war.

**Tabelle 25: Einstellen der gewünschten Chloroquin-Konzentration des TAE-Laufpuffers**

<b>Konzentration</b>	<b>Chloroquin-Stocklösung (<math>25 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}</math>) auf 1 L 1x TAE-Puffer</b>
$2,5 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$	100 $\mu\text{L}$
$7,5 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$	300 $\mu\text{L}$
$15,0 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$	600 $\mu\text{L}$
$25,0 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$	1000 $\mu\text{L}$

Die aufzutrennenden Proben wurden mit  $\frac{1}{5}$  Probenvolumen des Probenpuffers versetzt und in die Kammern des Gels aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei  $2,5\text{-}10 \text{ V cm}^{-1}$  für 2-15 h durchgeführt. Anschließend wurde das Chloroquin-Agarosegel für  $2 \times 30 \text{ min}$  mit bidestilliertem  $\text{H}_2\text{O}$  auf einer Wippe inkubiert. Die Färbung der aufgetrennten DNA bzw. der Topoisomere erfolgte durch Inkubation des Chloroquin-Agarosegel in bidestilliertem  $\text{H}_2\text{O} + 0,8 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ethidiumbromid für 30 min. Anschließend wurde die Topoisomerverteilung unter UV-Licht (312-365 nm) dokumentiert.

#### **5.7.6. DNA-Rückgewinnung aus Agarosegelen oder enzymatischen Reaktionsansätzen mit dem kommerziellen Aufreinigungspaket „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Firma QIAGEN**

Das Prinzip der Extraktion beruht auf der DNA-Bindung an eine Silica-Membran in Gegenwart von Hochsalzpuffern, während Verunreinigungen aus der Säule ausgewaschen werden. Die DNA-Bande wurde aus dem Agarosegel mit einem Skalpell isoliert. Das Gelstück wurde dann in einem 2 mL-Reaktionsgefäß mit 3 Volumen Puffer QC überschichtet (100 mg Gel bzw. 100 mL Reaktionsansatz = 300  $\mu\text{L}$  QC-Puffer). Anschließend erfolgte eine Inkubation der Gelstücke im QC-Puffer bei  $50^\circ\text{C}$  bis die Gelstücke vollständig geschmolzen waren. Die DNA aus dem Agarosegel und aus enzymatischen Reaktionsansätzen wurde nun gemäß Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

## 5.8. Arbeiten mit eukaryontischen Zellen

### 5.8.1. Adhärenente Zellen

#### 5.8.1.1. Verwendete Zelllinie

**CHO-K1:** *Chinese Hamster Ovary* (ATCC 9618-CRL)

#### 5.8.1.2. Kulturnährmedien und Lösungen

PBS	137,00 mmol L <sup>-1</sup> NaCl 2,70 mmol L <sup>-1</sup> KCl 8,00 mmol L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O 1,47 mmol L <sup>-1</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 6,80-7,00
TEP	6,00 mmol L <sup>-1</sup> EDTA 0,10-0,20 % Trypsin in PBS
100x Penicillin/Streptomycinlösung	5000 $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}_{\text{PBS}}}$ Penicillin G 5000 $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}_{\text{PBS}}}$ Streptomycinsulfat
100x GlutaMAX <sup>TM</sup>	200,00mmol L <sup>-1</sup> L-Alanyl-L-Glutamin 0,85 % NaCl
Kulturnährmedium CHO-K1	„Nutrient Mixture F12 + GlutaMAX <sup>TM</sup> (HAM)“ (GIBCO) $\frac{1}{10}$ Volumen FCS $\frac{1}{100}$ Penicillin/Streptomycinlösung (100×)

#### 5.8.1.3. Herstellung von konditioniertem Kulturnährmedium für adhärenente und Suspensionszellen)

Das Zellkulturnährmedium („Nährmedium“) soll dabei die Komponenten bereitstellen, die für die Erfüllung des Nährstoffbedarfs der zu kultivierenden Zellen bzw. für das Wachstum der Zellen in einer kontrollierten, künstlichen und *in vitro*-Umgebung benötigt werden. Die Zusammensetzung von Nährmedien schließt üblicherweise essentielle Aminosäuren, Salze, Vitamine, Mineralien, Spurenelemente, Zucker, Lipide und Nukleoside ein. Sobald das

Nährmedium zur Inkubation von Zellen verwendet wurde, wird dieses als konditioniertes Nährmedium bezeichnet. Ein konditioniertes Nährmedium enthält zahlreiche Ursprungskomponenten des Nährmediums sowie zelluläre Metaboliten und ausgeschiedene Proteine, z.B. Wachstumsfaktoren, inflammatorische Mediatoren und andere extrazelluläre Proteine.

Zur Herstellung von konditioniertem Nährmedium wurde das Nährmedium (adhärente Zellen) bzw. die Zellsuspension (Suspensionszellen) 2-3 Tage nach der letzten Subkultivierung abgenommen. Die Vitalität der Zellen lag bei  $> 85 \%$ , die Zellkonzentration bei  $7 \times 10^5 - 1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ . Bei Verwendung von Suspensionszellen wurde die Zellsuspension zunächst für 5 min bei  $180 \times g$  zentrifugiert. Die Überstände der adhärenenten bzw. der Suspensionszellen nach der Zentrifugation wurden durch einen  $0,22\text{-}\mu\text{m}$ -Filter sterilfiltriert und bei  $2-8^\circ\text{C}$  für höchstens eine Woche gelagert. Durch die Filtration wird sichergestellt, dass sich keine Zellen im konditionierten Nährmedium befinden, außerdem wird zusätzlich die Gefahr der Kontamination minimiert. Das konditionierte Nährmedium wurde bei der Einzelzellklonierung in einem Verhältnis von 1:1 (v/v) mit frischem Kulturmedium gemischt, um die Proliferation der einzelnen Zelle bzw. von Zellen in geringer Zelldichte durch die im konditionierten Nährmedium enthaltenen Wachstumsfaktoren anzuregen. Die Zusammensetzung des konditionierten Nährmediums bleibt dabei undefiniert.

#### **5.8.1.4. Kultivierung von adhärenenten Zellen**

Die Zellen wurden jeweils in einer Zellkulturflasche ( $25-175 \text{ cm}^2$ ) bzw. Zellkulturplatten (6-24-Lochplatten) mit dem Nährmedium bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5 \%$   $\text{CO}_2$  im nass begasten Brutschrank kultiviert. Bei Konfluenz der Zellen wurden die Zellen im gewünschten Verhältnis (1:5, 1:10, 1:20) auf ein neues Kulturgefäß umgesetzt („passagiert/subkloniert“).

#### **5.8.1.5. Passagieren von Zellen**

Die Vitalität der Zellen sollte deutlich über  $90 \%$  liegen. Das Nährmedium im Kulturgefäß wurde verworfen und die Zellen mit vorgewärmten PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit TEP (z.B.  $1 \text{ mL}$  für eine  $25 \text{ cm}^2$ -Zellkulturflasche) überschichtet und 2-5 min bei  $37^\circ\text{C}$  im nass begasten Brutschrank inkubiert. Nach Ablösen der Zellen von der Oberfläche wurde die Reaktion bzw. die Aktivität des Komplexbildners EDTA mit 4 Volumen Nährmedium abgestoppt. Um die gewünschte Zellkonzentration herzustellen, wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit einer Fuchs-Rosenthal-Kammer gezählt und die gewünschte Menge an Zellen in ein neues Kulturgefäß mit frischem Nährmedium überführt.

### 5.8.1.6. Langzeitlagerung von Zellen

Einfriermedium 10 % DMSO in FCS

Zellen einer 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche (3×10<sup>6</sup> Zellen) wurden in der logarithmischen Wachstumsphase mit 1×PBS gewaschen und anschließend mit 1 mL TEP abgelöst. Die Zellen wurden in 4 mL Nährmedium aufgenommen und für 5 min bei 180x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 3 mL Einfriermedium aufgenommen und auf 3 Einfrier Röhrchen aufgeteilt (CORNING-COSTAR). Die Röhrchen wurden dann in einem mit Isopropanol gefüllten Einfriercontainer (NALGENE Cryo Freezing Container) bei -70 °C über Nacht eingefroren. Durch das Isopropanol kommt es zu einem linearen Herunterkühlen in 1 °C-Schritten. Die eingefrorenen Zellen wurden anschließend bei -196 °C in flüssigem N<sub>2</sub> gelagert. Zum Auftauen wurden die Zellen im Wasserbad auf 37 °C erwärmt, mit 5 mL Nährmedium gewaschen (Zentrifugation bei 180x g für 5 min) und schließlich in 5 mL Nährmedium aufgenommen und in einer 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im nass begasten Brutschrank kultiviert.

### 5.8.2. Suspensionszellen

#### 5.8.2.1. Verwendete Zelllinien

CHO-K1: *Chinese Hamster Ovary* (ATCC CCL61)

CAP: *E1-transformed Human Amniocytes* (CAP9E-Z78-5B3-1D5)

#### 5.8.2.2. Kulturnährmedien

Kulturnährmedium CHO-K1 ProCHO5-Nährmedium (LONZA)  
4 mmol L<sup>-1</sup> L-Glutamin  
 $\frac{1}{200}$  Anti-clumping agent (GIBCO)

Kulturnährmedium CAP Protein Expression Medium (PEM; GIBCO) oder  
SFM-II-Medium (GIBCO)  
4 mmol L<sup>-1</sup> L-Glutamin

#### 5.8.2.3. Kultivierung von Suspensionszellen

Die Zellen wurden je nach Volumen in 384- bis 6-Lochplatten, 50 mL-TubeSpin<sup>®</sup>-Bioreaktoren oder Zellkultur-Erlenmeyerkolben mit dem jeweiligen serumfreien Nährmedium bei 37 °C, 5-8 % CO<sub>2</sub> und 160 Upm auf einem Orbitalschüttler mit einem

#### 5.8.2.4. Passagieren von Suspensionszellen

#### 5.8.2.5. Langzeitlagerung von Suspensionszellen

Einfriermedium (CAP)                      10 % DMSO in PEM-Nährmedium

### 5.8.3. Transfektionsmethoden

### 5.8.3.1. Transfektionsmethoden für adhärente CHO-K1-Zellen

Für die Lipofektion wird das kationische Lipid N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid (DOTMA) verwendet. Kleine Liposomen, die DOTMA enthalten, interagieren mit DNA und formen einen Lipid-DNA-Komplex mit vollständigem Einbau der DNA. DOTMA erleichtert die Fusion des Komplexes mit der Plasmamembran, so dass es zur

Aufnahme des Komplexes durch Endozytose kommt. Die Methode der Lipofektion ist einfach, gut reproduzierbar und effektiv für die transiente und stabile Expression von transfizierter DNA.

Vier Stunden vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel mit serumfreiem Nährmedium. Für die Transfektion von am Vortag ausgesäten Zellen (ca.  $3 \times 10^5$ ) auf einer 6-Loch-Zellkulturplatte wurde 1 µg DNA mit *DNA diluent B* auf ein Volumen von 25 µL verdünnt und 5 min bei RT inkubiert. In einem anderen Gefäß wurden 3,5 µL des GenePORTER<sup>TM</sup>-2-Reagenz mit 21,5 µL serumfreiem HamF12-Nährmedium gemischt. Die DNA-Lösung wurde vorsichtig zu der GenePORTER<sup>TM</sup>-2-Lösung gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei RT wurde die Mischung vorsichtig auf die Zellen pipettiert. Am nächsten Tag wurde das komplette HamF12-Nährmedium gegen frisches serumhaltiges HamF12-Nährmedium ausgetauscht. Für die Transfektion von niedrig konzentrierter Minicircle-DNA musste das Protokoll modifiziert werden. In diesem Fall wurden die am Vortag auf 6-Loch-Platten ausgesäten Zellen ( $3 \times 10^5$ ) mit etwa 15-25 µL *Minicircle*-DNA (Konzentration 50-100 ng µL<sup>-1</sup>) transfiziert. Das Transfektionsvolumen betrug 1 mL serumfreies HamF12-Nährmedium. Die Minicircle-DNA wurde mit *DNA diluent B* auf 50 µL aufgefüllt und 5 min bei RT inkubiert. Es wurden 10 µL des GenePORTER<sup>TM</sup>-2-Reagenz mit 40 µL serumfreiem HamF12-Nährmedium vermischt eingesetzt.

#### **5.8.3.1.2. Transfektion durch Lipofektion mit „Lipofectamine 2000“ von INVITROGEN**

Für die Lipofektion wird das kationische Lipid 2,3-dioleoyloxy-N-[2-(spermine-carbox-amido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanammonium (DOSPA) verwendet. Am Vortag wurden  $6 \times 10^4$  Zellen in einer 24-Loch-Zellkulturplatte ausgesät und bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im nass begasten Brutschrank über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurden pro Transfektion 2,5 µL Lipofectamine 2000 in 47,5 µL serumfreies HamF12-Nährmedium gegeben. Weiterhin wurden 250 ng DNA mit serumfreiem HamF12-Nährmedium auf ein Volumen von 50 µL gebracht. Beide Ansätze wurden getrennt 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze zusammengegeben und 20 min bei RT inkubiert. Das gesamte Medium wurde von den Zellen abgenommen und verworfen. Der gesamte Lipofektionsansatz wurde auf die Zellen geträufelt. Durch Zugabe von 900 µL frischem, serumhaltigen HamF12-Nährmedium (ohne Antibiotika) wurde ein Gesamtvolumen von 1 mL erreicht. Nach einer Inkubationszeit von 4 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im nass begasten Brutschrank wurde das gesamte

Nährmedium gegen frisches, serumhaltiges HamF12-Nährmedium (ohne Antibiotika) ausgetauscht.

### **5.8.3.2. Transfektionsmethoden für Suspensionszellen**

#### **5.8.3.2.1. „Nucleofection“ mit dem AMAXA-System von LONZA**

Zwei bis drei Tage vor der Transfektion wurden die Zellen passagiert bzw. subkultiviert. Am Tag der Transfektion lag die Vitalität der Zellen bei >85 %.  $5 \times 10^6$  Zellen wurden bei 180x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 100 µL Nucleofectorreagenz aufgenommen. Anschließend wurden 3 µg DNA zu den Zellen gegeben. Das gesamte Volumen wurde danach in die Nucleofektionsküvette transferiert und die Nucleofection mit dem Programm U23 im AMAXA-Nucleofector durchgeführt. Nach der Zugabe von 500 µL Nährmedium wurden die Zellen in 25 mL Nährmedium transferiert und bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im begasten Schüttelinkubator (160 Upm, Radius 2,5 cm) kultiviert.

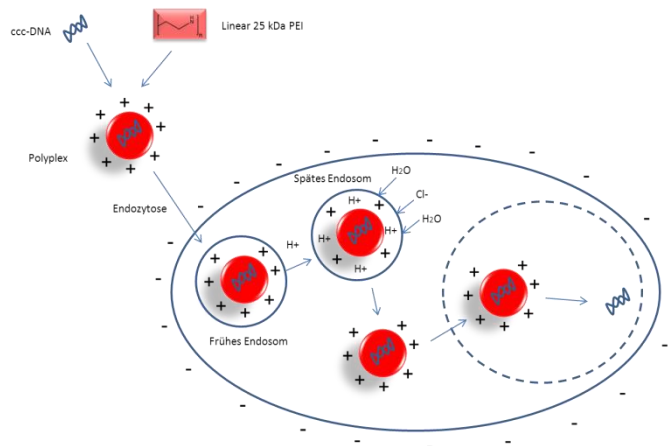
#### **5.8.3.2.2. Elektroporation mit dem NEON™-System von INVITROGEN**

Zwei bis drei Tage vor der Transfektion wurden die Zellen subkultiviert. Am Tag der Transfektion lag die Vitalität der Zellen bei >85 %.  $3 \times 10^6$  Zellen wurden bei 90x g für 10 min zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 100 µL Reagenz R incl. 3 µg DNA aufgenommen. Das gesamte Volumen wurde mit einer NEON™-Pipette aufgezogen und in ein mit 3 mL Puffer E2 gefülltes NEON™-Gefäß im NEON™-Elektroporator eingespannt. Die Elektroporation erfolgte mit dem Programm A (1800 V, 20 ms, 1 Puls). Danach wurde das gesamte Volumen in 12 mL Nährmedium aufgenommen und bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im begasten Schüttelinkubator (160 Upm, Radius 2,5 cm) kultiviert.

#### **5.8.3.2.3. Transfektion mit 25 kDa-Polyethylenimin (PEI)**

Kationische Substanzen kondensieren die DNA durch ionische Interaktionen und vermitteln die Interaktion mit der negativ geladenen Zelloberfläche. Sehr häufig wird für die Transfektion von Suspensionszellen das kationische Polymer Polyethylenimin („*linear PEI*“) verwendet.<sup>[291,292]</sup> Nach der Interaktion des PEI/DNA-Komplexes mit der Zellmembran kommt es zur Endozytose des PEI/DNA-Komplexes in die Zelle. In der Zelle kommt es nun zu einem Zufluss von Chloridionen in das Endosom. Durch den osmotischen Effekt platzt das Endosom und der PEI/DNA-Komplex wird freigesetzt. Die PEI/DNA-Komplexe gelangen überwiegend während der Mitose in den Zellkern, da bei diesem Prozess die Kernmembran kurzzeitig aufgelöst wird.<sup>[293]</sup>





**Abbildung 63: Schematische Darstellung der DNA-Transfektion mittels 25 kDa PEI** [nach 294 modifiziert]

Durch ihre positive Ladung bilden die PEI-Moleküle mit der DNA Komplexe aus, die durch Endozytose in die Zelle gelangen. Es kommt durch Einstrom von  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{Cl}^-$ -Ionen zum Platzen des Endosoms, sodass der PEI/DNA-Komplex bereits kurz nach der Aufnahme in die Zelle freigesetzt wird. Durch diese frühe Freisetzung wird der Abbau der DNA in Lysosomen verhindert. Weiterhin soll durch das PEI der Transport zum Zellkern erleichtert werden.<sup>[294]</sup>

Die Transfektion wurde gemäß de los Milagros Bassani Molinas<sup>[295]</sup> durchgeführt. Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in einer Zellkonzentration von  $5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  in einer 24-Lochplatte ausgesät. Am Tag der Transfektion sollte die Vitalität der Zellen bei  $>90\%$  liegen. Es wurden  $1 \times 10^6$  Zellen bei 180x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen mit 5 mL HamF12-Nährmedium (CHO-K1) oder FreeStyle293-Nährmedium (CAP) gewaschen und erneut bei 180x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und die Zellen in 900  $\mu\text{L}$  HamF12-Nährmedium (CHO K1) oder FreeStyle293-Nährmedium (CAP) resuspendiert und in einen Napf einer 24-Loch-Zellkulturplatte transferiert. Die DNA wurde mit HamF12-Nährmedium (CHO-K1) oder FreeStyle293-Nährmedium (CAP) auf ein Volumen von 97  $\mu\text{L}$  verdünnt. Nach einer Inkubationszeit von 2-5 min bei RT erfolgte die Zugabe von 3  $\mu\text{L}$  PEI-Stocklösung ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$  25 kDa-PEI in  $\text{H}_2\text{O}$ , sterilfiltriert). Der Ansatz wurde 10 min bei RT inkubiert und anschließend zu den Zellen gegeben. Die Kultivierung erfolgte bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\% \text{ CO}_2$  (CHO-K1) bzw.  $8\% \text{ CO}_2$  (CAP) im begasten Brutschrank mit Schüttler (0,16 cm Radius, 300 Upm). 5 h nach der Zugabe des DNA/PEI-Gemisches wurde das Volumen durch Zugabe von 1 mL ProCHO5-Komplettmedium (CHO-K1) oder PEM-Komplettmedium (CAP) auf 2 mL erhöht.

#### **5.8.4. Selektion von exprimierenden Zellen**

##### **5.8.4.1. Selektion durch Puromycin-Resistenz**

2-3 Tage nach der Transfektion mit einem Plasmid, welches ein Puromycin-Resistenzgen enthielt, wurden die Zellen bei 180x g für 5 min zentrifugiert und in frischem Nährmedium aufgenommen. Durch Zugabe von  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  Puromycin (CHO-K1-Zellen) wurde die Selektion gestartet. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5-8 % CO<sub>2</sub> und 160 Upm auf einem Orbitalschüttler mit einem Schütteldurchmesser von 2,5 cm kultiviert. Nur die Zellklone, die die Puromycin-Resistenz durch das transfizierte Plasmid besitzen, überleben in diesem Selektionsmedium. Alle 3-4 Tage wurde die Zellzahl und Vitalität der Zellen bestimmt. Die Zellen wurden gemäß 5.8.2.4. in frischem Selektionsmedium (Nährmedium +  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  Puromycin) subkultiviert. Lag die Zellzahl der vitalen Zellen bei  $< 2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  wurde das gesamte Volumen bei 180x g für 5 min zentrifugiert und in demselben Volumen an frischem Selektionsmedium resuspendiert.

##### **5.8.4.2. Durchflusszytometrie („*Fluorescence-activated cell sorting*“, FACS)**

FACS ist eine besondere Art der Durchflusszytometrie. Bei dieser Methode ist es möglich eine heterogene Mischung von Zellen gemäß ihrer Lichtstreuung und Fluoreszenzeigenschaften in zwei oder mehrere Behälter zu sortieren.<sup>[Fehler! Textmarke nicht definiert.]</sup> Als Fluoreszenzmarker wurde in dieser Arbeit das EGFP („*enhanced green fluorescent protein*“), welches auf dem jeweiligen MiniCircle codiert ist, verwendet. Das Anregungsmaximum liegt in diesem Fall bei 488 nm und das Emissionsmaximum bei 507 nm. Mithilfe dieser Methode wurden Zellpopulationen sortiert, sowie Einzelzellablagen durchgeführt.

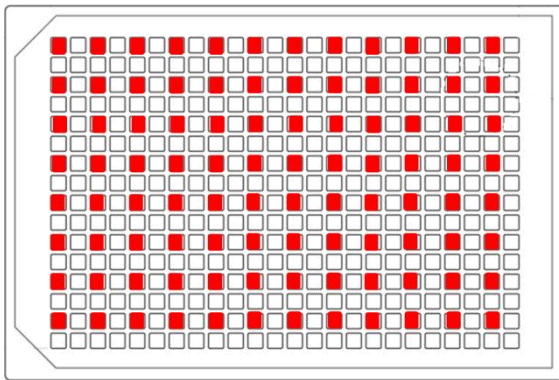
Vor der FACS-Sortierung wurden  $5 \times 10^6$  Zellen bei 180x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 mL 1×PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 180x g für 5 min wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 1-3 mL 1×PBS resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen überführt. Anschließend wurde die FACS-Sortierung auf EGFP-Fluoreszenz durchgeführt. Die sortierten Zellen wurden in 1 mL Nährmedium (+  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  Gentamycin) aufgenommen bzw. gesammelt.

##### **5.8.4.3. Einzelzellklonierung**

Zur Etablierung von Zelllinien mit stabiler Vektor-Expression wurden die Zellen 1-4 Tage nach erfolgter Transfektion mithilfe der in 5.8.4.2. beschriebenen Methode (FACS) auf ihre

EGFP-Fluoreszenz selektiert (1. Sortierung). Die EGFP-exprimierende Zellpopulation wurde in frischem Nährmedium (+ 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Gentamycin) in einer Zellkonzentration von  $2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  bei 37 °C und 5-8%  $\text{CO}_2$  kultiviert. Die Einzelzellklonierung erfolgte dann 10-14 Tage nach der Transfektion durch unterschiedliche Verfahren:

(A) Die Zellen wurden mittels FACS erneut auf ihre EGFP-Expression sortiert, zwei Tage kultiviert und anschließend je 1 Zelle pro Loch (theoretische Zellzahl) durch „*limiting dilution*“ auf 384-Loch-Platten ausgesät. Dazu wurde zunächst die Zellzahl der Zellpopulation bestimmt. Die Vitalität der Zellen sollte bei > 85 %, die Zellkonzentration bei  $7 \times 10^5$ - $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  liegen. Für die Durchführung der „*limiting dilution*“ wurden 4 Verdünnungsstufen hergestellt. Die hier angegebenen Mengen wurden zum Anlegen von 20×384-Loch-Zellkulturplatten, wobei jeweils 96 Zellen in einer 384-Loch-Zellkulturplatte abgelegt wurden, verwendet (Abbildung 64). Es wurden die in Tabelle 26 angegebenen Verdünnungsstufen mit auf RT temperiertem Nährmedien durchgeführt.



**Abbildung 64:** Belegung einer 384-Loch-Zellkulturplatte bei der „*limiting dilution*“

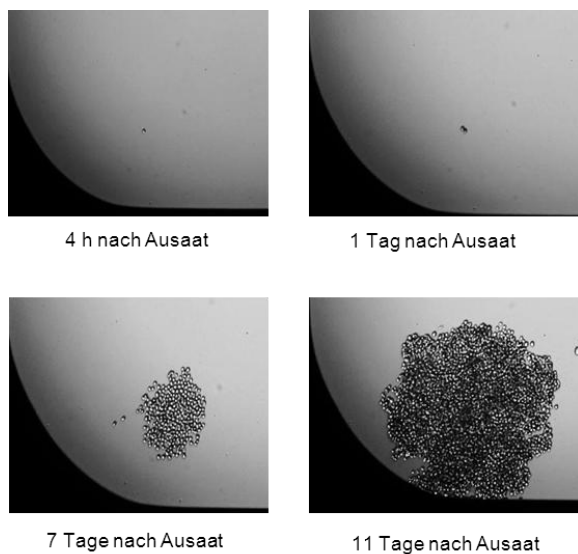
Die, je mit einer Zelle, belegten Felder sind rot markiert.

**Tabelle 26:** Verdünnungsstufen der „*limiting dilution*“

Bezeichnung	Zelldichte [Zellen/mL]	Herstellung/Medium
V1	$1,25 \times 10^5$	Je nach gemessener Zelldichte mit frischem Nährmedium herstellen
V2	$1,25 \times 10^4$	2 mL V1 + 18 mL frisches Nährmedium
V3	$1,25 \times 10^3$	2 mL V2 + 18 mL frisches Nährmedium
V4	12,50	2 mL V3 + 100 mL konditioniertes Nährmedium + 98 mL frisches Medium

Es wurden jeweils  $96 \times 80 \mu\text{L}_{\text{V4}}$  auf eine 384-Loch-Zellkulturplatte gegeben (Belegung s. Abbildung 64). Die Zellen wurden bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\% \text{CO}_2$  im nass begasten Brutschrank kultiviert. Am Tag der Aussaat, 1, 7 und 11-14 Tage nach der Aussaat wurde jeweils das Zellwachstum der Zellklone mit einem Lichtmikroskop oder einem automatischen Mikroskop (Abbildung 65) dokumentiert.

(B) Die Zellen wurden mittels FACS erneut auf ihre EGFP-Expression sortiert, dabei jedoch direkt auf 384- oder 96-Loch-Platten abgelegt. Bei diesem Verfahren wurde vor der Sortierung zunächst frisches/konditioniertes Nährmedium (Verhältnis 50:50) +  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  Gentamycin in den Platten vorgelegt (384-Loch-Zellkulturplatte =  $80 \mu\text{L}$ , 96-Loch-Zellkulturplatte =  $150 \mu\text{L}$ ). Bei der Direktablage wurde jedes Loch einer Platte mit einer Zelle belegt. Die Zellen wurden bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\% \text{CO}_2$  im nass begasten Brutschrank kultiviert. Am Tag der Aussaat, 1, 7 und 11-14 Tage nach der Aussaat wurde jeweils das Zellwachstum der Zellklone mit einem Lichtmikroskop oder einem automatischen Mikroskop (Abbildung 65) dokumentiert.



**Abbildung 65:** Verlauf des Wachstums eines Einzelklons nach der Einzelzellablage bzw. „limiting dilution“

11-14 Tage nach der Transfektion wurden die Einzelklone je nach Zelldichte in 24- oder 96-Loch-Zellkulturplatten umgesetzt bzw. expandiert. Die Expansion der Zellen wurde über die Zeit bis zu einem Volumen von  $20 \text{ mL}$  pro Zellklon durchgeführt.

### 5.8.5. IgG-Nachweis durch ELISA („Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay“)

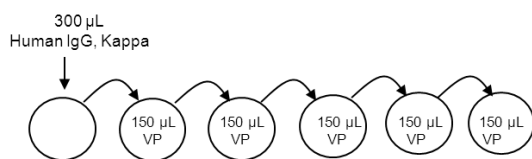
#### Antikörper

Coating-Antikörper	<i>Anti-Human IgG</i> (Fab-spezifisch) (SIGMA-ALDRICH)
Standard-Antikörper	<i>Human IgG1, Kappa</i> (SIGMA-ALDRICH)
enzymgekoppelter Antikörper	<i>Goat-Anti-Human IgG</i> (Fc), Peroxidase-gekoppelt (PIERCE)

#### Chemikalien

10×PBS	160 g NaCl 28,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ 4 g KCl 4 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ auf 2 L mit bidestilliertem $\text{H}_2\text{O}$ auffüllen, pH 7,2
Carbonat-Puffer (50 mL)	16 ml 0,2 mol $\text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (M = 105,99 g/mol) 34 ml 0,2 mol $\text{L}^{-1}$ $\text{NaHCO}_3$ (M = 84 g/mol)
Blocking-Puffer (500 mL)	15 g BSA 250 $\mu\text{L}$ Tween 20 auf 500 mL mit 1×PBS auffüllen
Verdünnungspuffer	4 mL Blocking-Puffer 44 mL bidestilliertes $\text{H}_2\text{O}$
10×Waschpuffer	990 mL 10×PBS 10 mL Tween 20
Farbreaktionsmix	2,53 mL 0,2 mol $\text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 2,47 mL 0,1 mol $\text{L}^{-1}$ Zitronensäure 5 mL bidestilliertes $\text{H}_2\text{O}$ 4 mg p-Phenylendiamindihydrochlorid 1,2 $\mu\text{L}$ $\text{H}_2\text{O}_2$
1 N $\text{H}_2\text{SO}_4$	27,8 mL konzentrierte $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 98% 972,2 mL bidestilliertes $\text{H}_2\text{O}$

Antikörper lassen sich als spezifische analytische Reagenzien einsetzen, um die Menge an Proteinen oder anderen Antigenen zu bestimmen. Diese Methode trägt den Namen „*enzyme-linked immunosorbent assay*“ (ELISAssay).<sup>[296]</sup> In dieser Arbeit wurde mithilfe des „Sandwich-ELISA“ die IgG-Herceptin-Produktivität von adhärennten CHO-K1-Zellen bestimmt. Zunächst wurde der Zellüberstand von nicht-konfluenten Zellen abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden mit 1×PBS gewaschen und anschließend mit frischem Nährmedium überschichtet. Nach 24 h wurde der Zellüberstand abgenommen, bei 10000 Upm zentrifugiert und direkt für den ELISAssay verwendet oder bei -20 °C gelagert. Weiterhin wurde die Zellzahl, sowie die Vitalität der Zellen bestimmt. Für den ELISAssay wurden speziell beschichtete 96-Loch-Platten (F96 MicroWell™ Plates, Maxisorp) mit 100 µL pro Loch mit *anti-human IgG* (Fab-spezifisch, Verdünnung 1:5000 in Carbonatpuffer) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Antikörper verworfen, die Platte 3× mit 360 µL 1×Waschpuffer pro Loch gewaschen und für 30 min mit 360 µL pro Loch Blocking-Puffer bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Blocking-Puffer verworfen und die Platte erneut mit 360 µL 1×Waschpuffer pro Loch gewaschen. Der Standard-Antikörper (*human IgG1*, Kappa) wurde 1:10000 in Verdünnungspuffer verdünnt, so dass eine Konzentration von 100 ng<sub>IgG</sub> mL<sup>-1</sup> entstand. 300 µL von dem verdünnten Standard-Antikörper wurden in die erste Reihe einer unbeschichteten 96-well-Platte gegeben. In die Reihen 2-6 wurden je 150 µL Verdünnungspuffer gegeben. Anschließend wurde eine 1:2-Verdünnungsreihe, wie in Abbildung 66 dargestellt, hergestellt (jeweils dreifacher Ansatz). Die Verdünnung der Proben erfolgte analog mit dem Verdünnungspuffer in der 96-Loch-Platte.



**Abbildung 66: Schema zur Verdünnung des Standard-Antikörpers**

Es wird jeweils 150 µL des vorherigen Nüpfes in den folgenden Nüpf, in dem 150 µL Verdünnungspuffer (VP) vorgelegt wurde, gegeben. Damit wird jeweils eine 1:2-Verdünnung erreicht.

100 µL der Verdünnungen des Standard-Antikörpers und der Proben wurden mit einer 8-Kanal-Pipette analog in die beschichtete, bereits abgesättigte Platte gegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde das gesamte Plattenvolumen verworfen und die Platte erneut mit 360 µL 1×Waschpuffer pro Loch gewaschen. Nun wurde 100 µL/Loch Peroxidasegekoppelter *goat anti-human IgG* (Fc) (1:5000 in Verdünnungspuffer) auf die Platte gegeben

und für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem, dreimaligem Waschen mit 360  $\mu\text{L}$  1×Waschpuffer pro Loch wurde die Platte mit 100  $\mu\text{L}$  Farbreaktionsmix pro Loch bei RT inkubiert bis eine leichte Gelbfärbung auftrat. Die Reaktion wurde dann sofort mit 100  $\mu\text{L}$  1 N  $\text{H}_2\text{O}_2$  pro Loch abgestoppt. Die Extinktion wurde bei 490 nm im ELISA-Lesegerät vermessen und dokumentiert. Die Standardkurve wurde anschließend mit dem Programm Microsoft Excel erstellt und die Konzentration aufgrund dieser Kurve errechnet. Die in Tabelle 27 dargestellten Kontrollen wurden jeweils auf einer Platte mitgeführt.

**Tabelle 27: Eingesetzte Kontrollen bei dem ELISAssay**

Bezeichnung	Coating-Antikörper	Standard-Antikörper	Peroxidase-gekoppelter Antikörper
A	-, stattdessen BSA	+	+
B	+	+	-
C	+	-	+
D	-	-	+
E	+	-	-
F	-	+	-

## 5.9. Produktion und Aufreinigung von Minicircle-DNA

Das Enzym FlpE-Rekombinase<sup>[297]</sup> ist eine Integrase und katalysiert eine genetische Rekombination. Hierbei kommt es zur Spaltung und Neuverknüpfung von DNA-Abschnitten, was *in vivo* zur genetischen Diversität führt und die Reparatur mutierter DNA ermöglicht. Die Rekombination, d.h. die Spaltung und Neuverknüpfung der DNA, findet ausschließlich zwischen FRT-Rekombinaseerkennungstellen (FRT-*sites*) statt. In dieser Arbeit wurde die Flp-Rekombinase zur Generierung des Minicircles aus dem Parentalplasmid, welches zwei FRT-*sites* enthält, die die Minicircle-Sequenz flankieren, verwendet.

### 5.9.1. Vermehrung und Rekombination der DNA in MM294-Flp-*E. coli*-Zellen

Der *E. coli*-Stamm MM294<sup>[298]</sup> enthält das Gen für die FlpE-Rekombinase im Genom integriert. Dieses Gen steht unter der Kontrolle eines hitze-induzierbaren Promotors, d.h. dass die Expression dieses Gens erst durch die Erhöhung der Temperatur von 37 °C auf 42 °C erfolgt.

Das Parentalplasmid wurde in *E. coli* MM294 elektrotransformiert. Nach der Selektion auf kanamycinhaltigen Agarplatten wurde durch Kolonie-PCR und Sequenzierung ein Klon mit dem jeweiligen Parentalplasmid ausgewählt und als Glycerin-Stock konserviert.

Vor der Induktion wurden 200 mL Kanamycin-LB-Medium ( $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  Kanamycin) mit dem jeweiligen *E. coli*-MM294-Klon beimpft und über Nacht bei 300 Upm und  $30^\circ\text{C}$  in einem Erlenmeyerkolben mit Schikanen inkubiert. Die Kultur wurde anschließend für 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  und  $1200\times g$  zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 50 mL antibiotikafreiem LB-Medium resuspendiert und erneut bei  $4^\circ\text{C}$  für 10 min und  $1200\times g$  zentrifugiert. Schließlich wurde das Pellet in 120 mL antibiotikafreiem LB-Medium aufgenommen. Die Expression der FlpE-Rekombinase wurde nun durch Inkubation der Kultur in einem Erlenmeyerkolben für 20 min bei  $42^\circ\text{C}$  und 180 Upm induziert. Nach dem Senken der Temperatur auf  $35^\circ\text{C}$  für 150 min wurde diese erneut auf  $42^\circ\text{C}$  für 20 min erhöht und schließlich erneut auf  $35^\circ\text{C}$  für 60 min gesenkt.

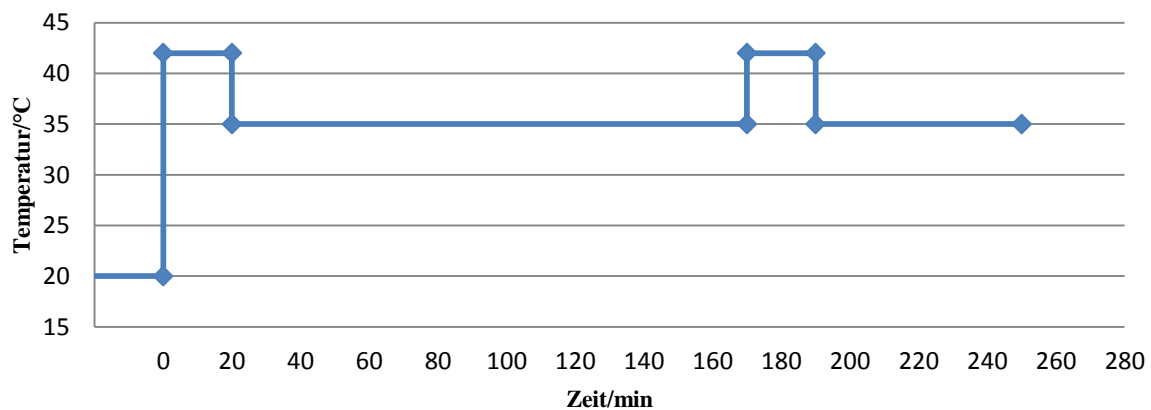


Abbildung 67: Temperaturverlauf der Hitzeinduktion über die Zeit

Die Kultur wurde nach der Hitzeinduktion bei  $6000\times g$  für 10 min und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet entweder zur späteren Plasmid-Aufreinigung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert oder direkt mit dem „Plasmid Maxi Kit“ (QIAGEN) gemäß Herstellerangabe aufgeschlossen und die Plasmid-DNA präpariert.



### **5.9.2. Vermehrung und Rekombination der DNA in EL250-Flp-*E. coli*-Zellen**

Der *E. coli*-Stamm EL250 <sup>[299]</sup> enthält ebenfalls das Gen für die FlpE-Rekombinase im Genom integriert. Dieses Gen steht unter der Kontrolle eines L-Arabinose-induzierbaren Promotors, d.h. dass die Expression dieses Gens erst durch die Zugabe von L-Arabinose in das Kulturmedium erfolgt. Die Induktion findet in M9-Minimalmedium statt, da Glukose oder Saccharose im LB Medium die Aufnahme der L-Arabinose stören würde.

Das Parentalplasmid wurde in *E. coli* EL250 elektrotransformiert. Nach der Selektion auf kanamycinhaltigen Agarplatten wurde durch Kolonie-PCR und Sequenzierung ein Klon mit dem jeweiligen Parentalplasmid ausgewählt und als Glycerin-Stock konserviert.

Vor der Induktion wurden 200 mL Kanamycin-LB-Medium (25 µg mL<sup>-1</sup> Kanamycin) mit dem jeweiligen *E. coli*-EL250-Klon beimpft und über Nacht bei 300 Upm und 30 °C in einem Erlenmeyerkolben mit Schikanen inkubiert. Die Kultur wurde anschließend für 10 min bei 4 °C und 1200x g zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 50 mL antibiotikafreiem, kaltem M9-Medium resuspendiert und erneut bei 4 °C für 10 min und 1200x g zentrifugiert. Schließlich wurde das Pellet in 200 mL antibiotikafreiem L-Arabinose-M9-Medium (0,3 % (w/v) L-Arabinose) aufgenommen. Die Inkubation bzw. Induktion der FlpE-Expression erfolgte für 5 h bei 180 Upm und 30 °C. Die Kultur wurde nach der L-Arabinose-Induktion bei 6000x g für 10 min und 4 °C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes konnte das Pellet entweder zur späteren Plasmid-Aufreinigung bei -20 °C gelagert oder direkt mit dem „Plasmid Maxi Kit“ (QIAGEN) gemäß Herstellerangabe aufgeschlossen und die Plasmid-DNA präpariert werden.

### **5.9.3. Aufreinigung der Minicircle-DNA aus dem entstehenden Plasmid-Gemisch durch Gelextraktion**

Nach der Rekombination liegt ein Plasmid-Gemisch, bestehend aus Parentalplasmid, Miniplasmid und Minicircle, vor. Dieses wurde mittels Restriktionsverdau mit einem Restriktionsenzym, dessen Schnittstelle ausschließlich in der Miniplasmid-Region liegt, behandelt. Dadurch wurde das Parentalplasmid und das Miniplasmid linearisiert, der Minicircle hingegen behielt seinen *supercoiled*-(ccc-)Status. Der Restriktionsansatz wurde anschließend mittels Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid aufgetrennt, die Minicircle-DNA aus dem Gel ausgeschnitten und unter Verwendung des „QIAquick Gel Extraction Kit“ von QIAGEN aufgereinigt.

#### 5.9.4. „*In vitro*“-Herstellung von Minicircle-DNA<sup>[300]</sup>

Bei dieser Methode wird die Minicircle-DNA aus dem in *E. coli* generierten Parentalplasmid komplett *in vitro* hergestellt. Diese Methode verspricht eine höhere Ausbeute und Reinheit der Minicircle-DNA im Labormaßstab.

Das Parentalplasmid wurde in *E. coli* XL1 Blue MRF<sup>c</sup> elektrotransformiert. Nach der Selektion auf kanamycinhaltigen Agarplatten wurde durch Kolonie-PCR und Sequenzierung ein Klon mit dem jeweiligen Parentalplasmid ausgewählt und als Glycerin-Stock konserviert.

Bei dieser Methode muss im Parentalplasmid die Minicircle-Region von der Miniplasmid-Region durch zwei gleiche Restriktionsschnittstellen getrennt vorliegen. Das Parentalplasmid (15 µg) wurde zunächst durch eine Restriktion über Nacht mit dem entsprechenden Restriktionsenzym (40 U) und der entsprechenden Temperatur in Miniplasmid und Minicircle gespalten. Durch Auftrennung des Minicircle/Miniplasmid-Gemisches auf einem 1% Agarosegel (gemäß 5.8.) wurde der Minicircle vom Miniplasmid getrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ von der Firma QIAGEN gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Anschließend wurde der lineare Minicircle mit einer T4-Ligase (800 U) für 2 h bei RT oder über Nacht bei 16 °C religiert. Dann wurde die DNA mit einer DNA-Gyrase (15 U) 2-24 h bei 37 °C in die ccc-Form überführt. Der ccc-Minicircle wurde dann erneut durch Gelelektrophorese (1% Agarosegel) von der restlichen DNA (oc, linear, ccc-Konkatemere) abgetrennt und mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ von QIAGEN aufgereinigt.

---

**6. Abkürzungen**

A	Ampere (SI-Einheit)
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ccc	<i>covalently closed circular DNA</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CIP	„ <i>calf intestinal phosphatase</i> “
cm	Zentimeter ( $= 10^{-2} \text{ m}$ )
DNA	Desoxyribonukleinsäure („ <i>desoxyribonucleic acid</i> “)
dpt	<i>days post transfection</i> (Tage nach der Transfektion)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	„ <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> “
ER	Endoplasmatisches Reticulum
F	Farad ( $1 \text{ F} = \text{A}^2 \text{ s}^4 \text{ kg}^{-1} \text{ m}^{-2}$ )
FACS	„ <i>fluorescence activated cell sorting</i> “
g	Erdbeschleunigung ( $= 9,81 \text{ m s}^{-2}$ )
h	Stunde/n
HC	<i>heavy chain</i> (schwere Antikörperkette)
HR	homologe Rekombination
IgG	<i>Immunglobulin G</i>
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton (atomare Masseneinheit)
kV	Kilovolt ( $= 10^3 \text{ V}$ )
L	Liter
LB	„ <i>lysogeny broth</i> “ (komplexes Nährmedium)
LC	<i>light chain</i> (leichte Antikörperkette)

---

m	Meter
MC	<i>Minicircle</i>
min	Minute/n
mL	Milliliter (= $10^{-3}$ L)
n.a.	<i>not available</i> (nicht gemessen)
n.d.	<i>not detectable</i> (nicht messbar)
NHEJ	<i>non-homologous end-joining</i> (nichthomologe Rekombination)
nm	Nanometer (= $10^{-9}$ m)
oc	<i>open circle DNA</i>
OD	Optische Dichte
pcd	<i>pg per cell per day</i> (pg <sub>Produkt</sub> pro Zelle pro Tag)
PCR	„ <i>polymerase chain reaction</i> “
PEI	Polyethylenimin
pt	<i>post transfection</i> (nach der Transfektion)
RNA	Ribonukleinsäure („ <i>ribonucleic acid</i> “)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde (SI-Einheit)
S/MAR	<i>scaffold matrix attachment region</i>
SAP	„ <i>shrimp alkaline phosphatase</i> “
SIDD	„ <i>stress induced duplex destabilization profile</i> “
TB	“ <i>terrific broth</i> ” (komplexes Nährmedium)
TM	“ <i>unregistered trade mark</i> ”
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität, $1\text{ U} = 1\mu\text{mol}_{\text{Substrat}}\text{ min}^{-1}$ )
ü.N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	<i>untranslated region</i>
V	Volumen

---

V	Volt
z.B.	zum Beispiel
$\Omega$	Ohm ( $1 \Omega = \text{kg m}^2 \text{ A}^{-2} \text{ s}^{-3}$ )
%	Prozent
(v/v)	Verhältnis Volumen zu Volumen
(w/v)	Verhältnis Gewicht zu Volumen
°C	Grad Celsius
$\mu\text{g}$	Mikrogramm ( $= 10^{-6} \text{ g}$ )
$\mu\text{L}$	Mikroliter ( $= 10^{-6} \text{ L}$ )
$\mu\text{m}$	Mikrometer ( $= 10^{-6} \text{ m}$ )

---

## 7. Literatur

- [1] Wissen Media Verlag, Gütersloh
- [2] Internetseite: [www.abcam.com](http://www.abcam.com)
- [3] Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward DC. 1988. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet* 80: 224-234.
- [4] Bridger JM, Herrmann H, Munkel C, Lichter P. 1998. Identification of an interchromosomal compartment by polymerization of nuclear-targeted vimentin. *J Cell Sci* 111: 1241-1253.
- [5] Lawrence JB, Singer RH, Marselle LM. 1989. Highly localized tracks of specific transcripts within interphase nuclei visualized by in situ hybridization. *Cell* 57: 493-502.
- [6] Cremer T, Cremer C. 2001. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature Rev Genet* 2: 292-301.
- [7] Hassan AB, Cook PR. 1993. Visualization of replication sites in unfixed human cells. *J Cell Sci* 105: 541-550.
- [8] Hozak P, Hassan AB, Jackson DA, Cook PR. 1993. Visualization of replication factories attached to nucleoskeleton. *Cell* 73: 361-373.
- [9] Jackson DA, Hassan AB, Errington RJ, Cook PR. 1993. Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. *EMBO J* 12: 1059-1065.
- [10] Fey EG, Penman S. 1988. Nuclear matrix proteins reflect cell type of origin in cultured human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 121-125.
- [11] Nickerson JA, Krochmalnic G, Wan KM, Penman S. 1989. Chromatin architecture and nuclear RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 177-181.
- [12] Ma H, Siegel AJ, Berezney R. 1999. Association of chromosome territories with the nuclear matrix. Disruption of human chromosome territories correlates with the release of a subset of nuclear matrix proteins. *J Cell Biol* 146: 531-542.
- [13] Felsenfeld G, Groudine M. 2003. Controlling the double helix. *Nature* 421: 448-453.
- [14] Ludérus MEE, de Graaf A, Mattia E, den Blaauwen, JL, Grande MA, de Jong L, van Driel R. 1992. Binding of matrix attachment regions to lamin B1. *Cell* 70: 949-959.
- [15] Ludérus MEE, Den Blaauwen JL, De Smit OJB, Compton DA, van Driel R. 1994. Binding of matrix attachment regions to lamin polymers involves single stranded regions and the minor groove. *Mol Cell Biol* 14: 6297-6305.

- 
- [16] Foster KA, Collins JM. 1985. The interrelation between DNA synthesis rates and DNA polymerases bound to the nuclear matrix in synchronised HeLa cells. *J Biol Chem* 260: 4229-4235.
- [17] Burdon RH, Qureshi M, Adams RLP. 1985. Nuclear matrix-associated DNA methylase. *Biochem Biophys Acta* 825: 70-79.
- [18] Hendzel MJ, Delcuve GP, Davie JR. 1991. Histone deacetylase is component of the internal nuclear matrix. *J Biol Chem* 266: 21936-21942.
- [19] Hendzel MJ, Sun JM, Chen HY, Rattner JB, Davie JR. 1994. Histone acetyltransferase is associated with the nuclear matrix. *J Biol Chem* 269: 22894-22901.
- [20] Lewis CD, Lebkowski JS, Daly AK, Laemmli UK. 1984. Interphase nuclear matrix and metaphase scaffolding structures. *J Cell Sci* 1: 103-122.
- [21] Roemig H, Fackelmayer FO, Renz A, Ramsperger U, Richter A. 1992. Characterization of SAF-A, a novel nuclear DNA binding protein from HeLa cells with high affinity for nuclear matrix/scaffold attachment DNA elements. *EMBO J* 11: 3431-3440.
- [22] Renz A, Fackelmayer FO. 1996. Purification and molecular cloning of the scaffold attachment factor B (SAF-B), a novel nuclear DNA binding protein from HeLa cells with high affinity for nuclear matrix/scaffold attachment DNA elements. *EMBO J* 11: 3431-3440.
- [23] Dickinson LA, Joh T, Kohwi Y, Kohwi-Shigematsu T. 1992. A tissue specific MAR/SAR DNA-binding protein with unusual binding site recognition. *Cell* 70: 631-645.
- [24] Dickinson LA, Dickinson CD, Kohwi Shigematsu T. 1997. An atypical homeodomain in SATB1 promotes specific recognition of the key structural element in a matrix attachment region. *J Biol Chem* 272: 11463-11470.
- [25] Weitzel JM, Buhrmeister H, Stratling WH. 1997. Chicken MAR-binding protein ARBP is homologous to rat methyl-CpG binding protein MeCP2. *Mol Cell Biol* 17: 5656-5666.
- [26] Gohring F, Fackelmayer FO. 1997. The scaffold/matrix attachment region binding protein hnRNP-U (SAF-A) is directly bound to chromosomal DNA in vivo: a chemical cross-linking study. *Biochemistry* 36: 8276-8283.
- [27] De Belle I, Cai S, Kohwi-Shigematsu T. 1998. The genomic sequences bound to special AT-rich sequence-binding protein 1 (SATB1) in vivo in Jurkat T cells are

- tightly associated with the nuclear matrix at the bases of the chromatin loops. *J Cell Biol* 141: 335-348.
- [28] Fackelmayer FO, Dahm K, Renz A, Ramsperger U, Richter A. 1994. Nucleic-acid-binding properties of hnRNP-U/SAF-A, a nuclear-matrix protein which binds DNA and RNA in vivo and in vitro. *Eur J Biochem* 221: 749-757.
- [29] Luderus ME, de Graaf A, Mattia E, den Blaauwen JL, Grande MA, de Jong L, van Driel R. 1992. Binding of matrix attachment regions to lamin B1. *Cell* 70: 949-959.
- [30] Renz A, Fackelmayer FO. 1996. Purification and molecular cloning of the scaffold attachment factor B (SAF-B), a novel human nuclear protein that specifically binds to S/MAR-DNA. *Nucleic Acids Res* 24: 843-849.
- [31] Martens JH, Verlaan M, Kalkhoven E, Dorsman JC, Zantema A. 2002. Scaffold/matrix attachment region elements interact with a p300-scaffold attachment factor A complex and are bound by acetylated nucleosomes. *Mol Cell Biol* 22: 2598-2606.
- [32] Gasser SM, Laemmli UK. 1986. Cohabitation of scaffold binding regions with upstream/enhancer elements of three developmentally regulated genes of *D. melanogaster*. *Cell* 46: 521-530.
- [33] Mirkovitch J, Gasser SM, Laemmli UK. 1988. Scaffold attachment of DNA loops in metaphase chromosomes. *J Mol Biol* 200: 101-110.
- [34] Phi-Van L, Strätling WH. 1988. The matrix attachment regions of the chicken lysozyme gene co-map with the boundaries of the chromatin domain. *EMBO J* 7: 655-664.
- [35] Cockerill PN, Yuen MH, Garrard WT. 1987. The enhancer of the immunoglobulin heavy chain locus is flanked by presumptive chromosomal loop anchorage elements. *J Biol Chem* 262: 5394-5397.
- [36] Cockerill PN. 1990. Nuclear matrix attachment occurs in several regions of the IgH locus. *Nucleic Acids Res* 18: 2634-2648.
- [37] Jarman AP, Higgs DR. 1988. Nuclear scaffold attachment sites in the human globin gene complexes. *EMBO J* 7: 3337-3344.
- [38] Levy-Wilson B, Fortier C. 1989. The limits of the DNaseI-sensitive domain of the human apolipoprotein B gene coincide with the locations of chromosomal anchorage loops and define the 5' and 3' boundaries of the gene. *J Biol Chem* 264: 21196-21204.



- 
- [39] Mielke C, Kohwi Y, Kohwi-Shigematsu T, Bode J. 1990. Hierarchical binding of DNA fragments derived from scaffold-attached regions: Correlation of properties in vitro and function in vivo. *Biochemistry* 29: 7475-7485.
- [40] Bode J, Maaß K. 1988. Chromatin domain surrounding the human interferon-beta gene as defined by scaffold-attached regions. *Biochemistry* 27: 4706-4711.
- [41] Amati B, Gasser SM. 1990. Nuclear scaffold-attached regions bind nuclear scaffolds and can function as ARS elements in both budding and fission yeasts. *Mol Cell Biol* 10: 5442-5454.
- [42] Mirkovitch J, Mirault ME, Laemmli UK. 1984. Organization of the higher order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold. *Cell* 39: 223-232.
- [43] Paul AL, Ferl RJ. 1998. Higher order chromatin structures in maize and Arabidopsis. *Plant Cell* 10: 1349-1359.
- [44] Mielke C, Benham C, Bode J, Breindl M. 2002. Nuclear matrix association potential of regulatory elements in the collagen 1a1 gene. *J Cell Biochem* 84: 484-496.
- [45] Cockerill PN, Yuen MH, Garrard WT. 1987. The enhancer of the immunoglobulin heavy chain locus is flanked by presumptive chromosomal loop anchorage elements. *J Biol Chem* 262: 5394-5397.
- [46] Jarman AP, Higgs DR. 1988. Nuclear scaffold attachment sites in the human globin gene complexes. *EMBO J* 7: 3337-3344.
- [47] Käs E, Laemmli UK. 1992. In vivo topoisomerase II cleavage of the *Drosophila* histone and satellite III repeats: DNA sequence and structural characteristics. *EMBO J* 11: 705-716.
- [48] Anderson JN. 1986. Detection, sequence patterns and function of unusual DNA structures. *Nucl Ac Res* 14: 8513-8533.
- [49] Von Kries J P, Buhrmester H, Strätling WH. 1991. A matrix/scaffold attachment region binding protein: Identification, purification, and mode of binding. *Cell* 64: 123-135.
- [50] Boulikas T. 1995. Chromatin domains and prediction of MAR-Sequences. *Int Rev Cytol* 162: 279-288.
- [51] Mielke C, Kohwi Y, Kohwi-Shigematsu T, Bode J. 1990. Hierarchical binding of DNA fragments derived from scaffold-attached regions: Correlation of properties in vitro and function in vivo. *Biochemistry* 29: 7475-7485.

- 
- [52] Bode J, Pucher H J, Maaß K. 1986. Chromatin structure and induction dependent conformational changes of human interferon- $\beta$  genes in a mouse host cell. *Eur J Biochem* 158: 393-401.
- [53] Bode J, Kohwi Y, Dickinson L, Joh T, Klehr D, Mielke C, Kohwi-Shigematsu T. 1992. Biological significance of unwinding capability of nuclear matrix associating DNAs. *Science* 255: 195-197.
- [54] Benham C, Kohwi-Shigematsu T, Bode J. 1997. Stress-induced duplex DNA destabilization in scaffold/matrix attachment regions. *J Mol Biol* 274: 181-196.
- [55] Singh GB, Kramer JA, Krawetz SA. 1997. Mathematical model to predict regions of chromatin attachment to the nuclear matrix. *Nucl Ac Res* 25: 1419-1425.
- [56] Winkelmann S, Klar M, Benham C., AK P, Goetze S, Gluch A, Bode J. 2006. The positive aspects of stress: Strain Initiates Domain Decondensation (SIDD). *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 5: 24-31.
- [57] Namciu SJ, Blochlinger KB, Fournier RE. 1998. Human matrix attachment regions insulate transgene expression from chromosomal position effects in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 18: 2382-2391.
- [58] Goetze S, Baer A, Winkelmann S, Nehlsen K, Seibler J, Maass K, Bode J. 2005. Performance of genomic bordering elements at predefined genomic loci. *Mol Cell Biol* 25: 2260-2272.
- [59] Klehr D, Schlake T, Maaß K, Bode J. 1991. Scaffold-attached regions (SAR elements) mediate transcriptional effects due to butyrate. *Biochemistry* 31: 3222-3229.
- [60] Bode J, Schlake T, Rios-Ramirez M, Mielke C, Stengert M, Kay V, Klehr-Wirth D. 1995. Scaffold matrix-attached regions: Structural properties creating transcriptionally active loci. *Int Rev Cytol* 162: 389-454.
- [61] Dang Q, Auten J, Plavec I. 2000. Human beta interferon scaffold attachment region inhibits de novo methylation and confers long-term, copy number-dependent expression to a retroviral vector. *J Virol* 74: 2671-2678.
- [62] Dijkwel PA, Hamlin JL. 1995. Origins of replication and the nuclear matrix: the DHFR domain as a paradigm. Structural and functional organization of the nuclear matrix. *Int Rev Cytol* 162: 455-484.
- [63] Carri MT, Micheli G, Graziano E, Pace T, Buongiorno-Nardelli M. 1986. The relationship between chromosomal origins of replication and the nuclear matrix during the cell cycle. *Exp Cell Res* 164: 426-436.

- 
- [64] Gluch A, Vidakovic M, Bode J. 2008. Scaffold/matrix Attachment Regions (S/MARs): Relevance for Disease and Therapy, Protein-Protein-Interactions as New Drug Targets. *Handbook of Experimental Pharmacology* 186: 67-103.
- [65] Vidakovic M, Poznanovic G, Bode J. 2005. DNA break repair: Refined rules of an already complicated game. *Biochem Cell Biol* 83: 365–373.
- [66] Goetze S. 2003. Funktionsanalysen nicht-kodierender genomischer DNA-Bereiche unter Berücksichtigung biomathematischer Modelle. Dissertation Technische Universität Braunschweig.
- [67] Bode J, Benham C, Knopp A, Mielke C. 2000. Transcriptional augmentation: modulation of gene expression by scaffold/matrix-attached regions (S/MAR elements). *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 10: 73-90.
- [68] Broll S, Oumard A, Hahn K, Schambach A, Bode J. 2010. Minicircle performance depending on S/MAR-nuclear matrix interactions, *J Mol Biol* 395 (5): 950-965.
- [69] Broll S. 2009. Selbstreplizierende nichtvirale Episomen (Minicircles): Expressionseigenschaften und Etablierung im Zellkern, Dissertation Technische Universität Braunschweig.
- [70] Brown CE, Lechner T, Howe L, Workman JL. 2000. The many HATs of transcription coactivators. *Trends Biochem Sci* 25: 15-19.
- [71] Kingston RE, Narlikar GJ. 1999. ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin remodeling. *Genes and Develop* 13: 2339-2352.
- [72] Lachner M, Jenuwein T. 2002. The many faces of histone lysine methylation. *Curr Opinion Cell Biol* 14: 286-298.
- [73] Reik W, Kelsey G, Walter J. 1999. Dissecting de novo methylation. *Nature Genet* 23: 380-382.
- [74] Strahl BD, Allis D. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403: 41-45.
- [75] Peterson CL, Laniel MA. 2004. Histone and histone modifications. *Curr Biol* 14: 546-551.
- [76] Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. 1997. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 13: 335–340.
- [77] Robertson K D. 2002. DNA methylation and chromatin unraveling the tangled web. *Oncogene* 21: 5361–5379.
- [78] Wade PA. 2005. SWItching off methylated DNA. *Nature Genet* 37: 212-213.
- [79] Knippers R. 2006. Molekulare Genetik. Thieme Verlag 9. Auflage.

- 
- [80] Lee SE, Moore JK, Holmes A, Umez K, Kolodner RD, Haber JE. 1998. *Saccharomyces* KU70, Mre11/Rad50, and RPA proteins regulates adaptin to G2/M arrest after DNA damage. *Cell* 94: 399-409.
- [81] Rich T, Allen RL, Wyllie AH. 2000. Defying death after DNA damage. *Nature* 407: 777-783.
- [82] Vamvakas S, Vock EH, Lutz WK. 1997. On the role of DNA double-strand breaks in toxicity and carcinogenesis. *Crit Rev Toxicol* 27: 155-174.
- [83] Haber JE. 2000. Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet* 16: 259-264.
- [84] Karran P. 2000. DNA double strand break repair in mammalian cells. *Curr Opin Genet Dev* 10: 144-150.
- [85] Holliday RA. 1964. Mechanism for gene conversion in fungi. *Genet Res* 5: 282-304
- [86] Meselson MS, Radding C. 1975. A general model of genetic recombination. *Proc Nat Acad Sci USA* 72: 358-361.
- [87] Tsuzuki T, Fujii Y, Sakumi K, Tominaga Y, Nakao K, Sekiguchi M, Matsushiro A, Yoshimura Y, Morita T. 1996. Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6236-6240.
- [88] Tashiro S, Walter J, Shinohara A, Kamada N, Cremer T. 2000. Rad51 accumulation at sites of DNA damage and in post replicative chromatin. *J Cell Biol* 150: 283-291.
- [89] Essers, J, Hendriks RW, Swagemakers SM, Troelstra C, de Wit J, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Kanaar R. 1997. Disruption of mouse RAD54 reduces ionizing radiation resistance and homologous recombination. *Cell* 89: 195-204.
- [90] Rijkers T, Van Den Ouweland J, Morolli B, Rolink AG, Baarends WM, Van Sloun PPH, Lohman PHM, Pastink A. 1998. Targeted inactivation of mouse RAD52 reduces homologous recombination but not resistance to ionizing radiation. *Mol Cell Biol* 18: 6423-6429.
- [91] Welcsh PL, Owens KN, King MC. 2000. Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends Genet* 16: 69-74.
- [92] Haber JE. 1999. DNA repair. Gatekeepers of recombination. *Nature* 398: 665-667.
- [93] Smith GC, Jackson SP. 1999. The DNA-dependent Proteinkinase. *Genes Dev* 13: 916-934.
- [94] Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S. 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Ann Rev Biochem* 73: 39-85.

- 
- [95] Ward JF. 1988. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation and reparability. *Progr Nucl Acid Res Mol Biol* 35: 95-125.
- [96] Frank KM, Sharpless NE, Gao Y, Sekiguchi JM, Ferguson DO, Zhu C, Manis JP, Horner J, DePinho RA, Alt FW. 2000. DNA ligase deficiency in mice leads to defective neurogenesis and embryonic lethality via the p53 pathway. *Mol Cell* 5: 993-1002.
- [97] Downs JA. 2007. Chromatin dynamics and the preservation of genetic information. *Nature* 447: 951-958.
- [98] Kim ST. 1999. Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *J Biol Chem* 274: 37538-37543.
- [99] Cliby WA, Roberts CJ, Cimprich KA, Stringer CM, Lamb JR, Schreiber SL, Friend SH. 1998. Overexpression of a kinase-inactive ATR protein causes sensitivity to DNA-damaging agents and defects in cell cycle checkpoints. *EMBO J* 2: 159-169.
- [100] Brown EJ, Baltimore D. 2000. ATR disruptin leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev* 14: 397-402.
- [101] Van den Bosch M, Lohman PH, Pastink A. 2002. DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Biol Chem* 383(6): 873-892.
- [102] Wang M, Wu WH, Wu W, Rosidi B, Zhang L, Wang H, Iliakis G. 2006. PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucl Acid Res* 34 (21): 6170-6182.
- [103] Bennardo N, Cheng A, Huang N, Stark JM. 2008. Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS Genet* 4(6): e1000110.
- [104] Khanna K, Jackson SP. 2001. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genet* 27: 247-254.
- [105] Karran P. 2000. DNA double strand break repair in mammalian cells. *Curr Opin Genet Dev* 10: 144-150.
- [106] Morrison C, Sonoda E, Takao N, Shinohara A, Yamamoto K, Takeda S. 2000. The controlling role of ATM in homologous recombinational repair of DNA damage. *EMBO J* 19: 463-471.
- [107] Lee SE, Mitchell RA, Cheng A, Hendrickson EA. 1997. Evidence for DNA-PK-dependent and -independent DNA double-strand break repair pathways in mammalian cells as a function of the cell cycle. *Mol Cell Biol* 17: 1425-1433.

- 
- [108] Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, Shinohara A, Takeda S. 1998. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J* 17: 5497-5508.
- [109] Haber JE. 1999. DNA recombination: the replication connection. *Trends Biochem Sci* 24: 271-275.
- [110] Thompson LH, Schild D. 2002. Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat Res* 509: 49-78.
- [111] Sargent RG, Brenneman MA, Wilson JH. 1997. Repair of site-specific double-strand breaks in a mammalian chromosome by homologous and illegitimate recombination. *Mol Cell Biol* 17: 267-277.
- [112] Liang F, Han M, Romanienko PJ, Jasin M. 1998. Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5172-5177.
- [113] Richardson C, Jasin M. 2000. Coupled homologous and nonhomologous repair of a double-strand break preserves genomic integrity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 20: 9068-9075.
- [114] Allen C, Kurimasa A, Brenneman MA, Chen DJ, Nickoloff JA. 2002. DNA-dependent protein kinase suppresses double-strand break-induced and spontaneous homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 3758-3763.
- [115] Colosimo A, Goncz KK, Holmes AR, Kunzelmann K, Novelli G, Malone RW, Bennett MJ, Gruenert DC. 2000. Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. *Biotechniques* 29: 314-318.
- [116] Salman HD, Zbaida D, Rabin Y, Chatenay D, Elbaum M. 2001. Kinetics and mechanism of DNA uptake into the cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 7247-7252.
- [117] Liang F, Jasin M. 1996. Ku80-deficient cells exhibit excess degradation of extrachromosomal DNA. *J Biol Chem* 271: 14405-14411.
- [118] Jenke BHC, Fetzer CP, Stehle IM, Jönsson F, Fackelmayer FO, Conradt H, Bode J, Lipps HJ. 2002. An episomally replicating vector binds to the nuclear matrix protein SAF-A in vivo. *EMBO Rep* 3: 349-354.
- [119] Gorman C, Padmanabhan R, Howard BH. 1983. High efficiency DNA-mediated transformation of primate cells. *Science* 221: 551-553.

- 
- [120] Staunton JE, Weaver DT. 1994. Scid cells efficiently integrate hairpin and linear DNA substrates. *Mol Cell Biol* 14: 3876–3883.
- [121] Vasquez KM, Marburger K, Intody Z, Wilson JH. 2001. Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 8403–8410.
- [122] Goncz KK, Prokopishyn NL, Chow BL, Davis BR, Gruenert DC. 2002. Application of SFHR to gene therapy of monogenic disorders. *Gene Therapy* 9: 691–694.
- [123] Babinet C, Cohen-Tannoudji M. 2001. Genome engineering via homologous recombination in mouse embryonic stem (ES) cells: an amazingly versatile tool for the study of mammalian biology. *An Acad Bras Cienc* 73: 365–383.
- [124] Smith K. 2001. Theoretical mechanisms in targeted and random integration of transgene DNA. *Reprod Nutr Dev* 41: 465–485.
- [125] Belmaaza A, Chartrand P. 1994. One-sided invasion events in homologous recombination at double-strand breaks. *Mutat Res* 314: 199–208.
- [126] Van den Bosch M, Lohman PH, Pastink A. 2002. DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Biol Chem* 383: 873–892.
- [127] Lin FL, Sperle K, Sternberg NL. 1990. Repair of double-stranded DNA breaks by homologous DNA fragments during transfer of DNA into mouse L cells. *Mol Cell Biol* 10: 113–119.
- [128] Lin FL, Sperle KM, Sternberg NL. 1987. Extrachromosomal recombination in mammalian cells as studied with single and double-stranded DNA substrates. *Mol Cell Biol* 7: 129–140.
- [129] Folger KR, Thomas K, Capecchi MR. 1985. Nonreciprocal exchanges of information between DNA duplexes coinjected into mammalian cell nuclei. *Mol Cell Biol* 5: 59–69.
- [130] Subramani S, Rubnitz J. 1985. Recombination events after transient infection and stable integration of DNA into mouse cells. *Mol Cell Biol* 5: 659–666.
- [131] Folger KR, Wong EA, Wahl G, Capecchi MR. 1982. Patterns of integration of DNA microinjected into cultured mammalian cells: evidence for homologous recombination between injected plasmid DNA molecules. *Mol Cell Biol* 2: 1372–1387.
- [132] Chen C, Chasin LA. 1998. Cointegration of DNA molecules introduced into mammalian cells by electroporation. *Somat Cell Mol Genet* 24: 249–256.
- [133] Merrihew RV, Marburger K, Pennington SL, Roth DB, Wilson JH. 1996. High-frequency illegitimate integration of transfected DNA at preintegrated target sites in a mammalian genome. *Mol Cell Biol* 16: 10–18.

- 
- [134] Calos MP, Lebkowski JS, Botchan MR. 1983. High mutation frequency in DNA transfected into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 3015–3019.
- [135] Wilson JH, Berget PB, Pipas JM. 1982. Somatic cells efficiently join unrelated DNA segments end-to-end. *Mol Cell Biol* 2: 1258–1269.
- [136] Wake CT, Gudewicz T, Porter T, White A, Wilson JH. 1984. How damaged is the biologically active subpopulation of transfected DNA. *Mol Cell Biol* 4: 387–398.
- [137] Würtele H, Gusew N, Lussier R, Chartrand P. 2005. Characterization of in vivo recombination activities in the mouse embryo. *Mol Gen Genomics* 273: 252–263.
- [138] Roth DB, Wilson JH. 1986. Nonhomologous recombination in mammalian cells: role for sequence homologies in the joining reaction. *Mol Cell Biol* 6: 4295–4304.
- [139] Burdon TG, Wall RJ. 1992. Fate of microinjected genes in preimplantation mouse embryo. *Mol Reprod Dev* 33: 436–442.
- [140] Nicolas AL, Young CSH. 1994. Characterization of DNA end joining in a mammalian cell nuclear extract: junction formation is accompanied by nucleotide loss, which is limited and uniform but not site specific. *Mol Cell Biol* 14: 170–180.
- [141] Remus R, Kämmer C, Heller H, Schmitz B, Schell G, Doerfler W. 1999. Insertion of foreign DNA into an established mammalian genome can alter the methylation of cellular DNA sequences. *J Virol* 73: 1010–1022.
- [142] Garrick D, Fiering S, Martin DIK, Whitelaw E. 1998. Repeat-induced gene silencing in mammals. *Nat Genet* 18: 56–59.
- [143] McBurney MW, Mai T, Yang X, Jardine K. 2002. Evidence for repeat-induced gene silencing in cultured mammalian cells: inactivation of tandem repeats of transfected genes. *Exp Cell Res* 274: 1–8.
- [144] Würtele H, Little KCE, Chartrand P. 2003. Illegitimate DNA integration in mammalian cells. *Gene Therapy* 10: 1791–1799.
- [145] Colbère-Garapin F, Ryhiner ML, Stephany I, Kourilsky P, Garapin AC. 1986. Patterns of integration of exogenous DNA sequences transfected into mammalian cells of primate and rodent origin. *Gene* 50: 279–288.
- [146] Lohrer H, Blum M, Herrlich P. 1988. Ataxia telangiectasia resists gene cloning: an account of parameters determining gene transfer into human recipient cells. *Mol Gen Genet* 212: 474–480.
- [147] Hoeijmakers JH, Odijk H, Westerveld A. 1987. Differences between rodent and human cell lines in the amount of integrated DNA after transfection. *Exp Cell Res* 169: 111–119.



- 
- [148] Mayne LV, Jones T, Dean SW, Harcourt SA, Lowe JE, Priestley A, Steingrimsdottir H, Sykes H, Green MH, Lehmann AR. 1988. SV-40-transformed normal and DNA repair deficient human fibroblasts can be transfected with high frequency but retain only limited amount of integrated DNA. *Gene* 66: 65–76.
- [149] Toneguzzo F, Keating A, Glynn S, McDonald K. 1988. Electric field mediated gene transfer: characterization of DNA transfer and patterns of integration in lymphoid cells. *Nucleic Acids Res* 16: 5515–5532.
- [150] Turan S, Galla M, Ernst E, Qiao J, Voelkel C, Schiedlmeier B, Zehe C, Bode J. 2011. Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE): traditional concepts and current challenges. *J Mol Biol* 407: 193–221.
- [151] Le Provost F, Lillico S, Passet B, Young R, Whitelaw B, Vilotte JL. 2009. Zinc finger nuclease technology heralds a new era in mammalian transgenesis. *Trends Biotechnol* 28(3): 134–141.
- [152] Gabriel R, Lombardo A, Arens A, Miller JC, Genovese P, Kaepfel C, Nowrouzi A, Bartholomae CC, Wang J, Friedman G, Holmes MC, Gregory PD, Glimm H, Schmidt M, Naldini L, von Kalle C. 2011. An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity. *Nature Biotechnol*, 29: 816–823.
- [153] Huang Y, Liu DP, Wu L, Li TC, Wu M, Feng DX, Liang CC. 2000. Proper developmental control of human globin genes reproduced by transgenic mice containing a 160-kb BAC carrying the human beta-globin locus. *Blood Cells Mol Dis* 26: 598–610.
- [154] Lamb BT, Sisodia SS, Lawler AM, Slunt HH, Kitt CA, Kearns WG, Pearson PL, Price DL, Gearhart JD. 1993. Introduction and expression of the 400 kilobase amyloid precursor protein gene in transgenic mice [corrected]. *Nat Genet* 5: 22–30.
- [155] Sarsero JP, Li L, Holloway TP, Voullaire L, Gazeas S, Fowler KJ, Kirby DM, Thorburn DR, Galle A, Cheema S, Koenig M, Williamson R, Ioannou PA. 2004. Human BAC-mediated rescue of the Friedreich ataxia knockout mutation in transgenic mice. *Mamm Genome* 15: 370–382.
- [156] Schiedner G, Morral N, Parks RJ, Wu Y, Koopmans SC, Langston C, Graham FL, Beaudet AL, Kochanek S. 1998. Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nat Genet* 18: 180–183.
- [157] DuBridge RB, Calos MP. 1988. Recombinant shuttle vectors for the study of mutation in mammalian cells. *Mutagenesis* 3: 1–9.

- 
- [158] Milanesi G, Barbanti-Brodano G, Negrini M, Lee D, Corallini A, Caputo A, Grossi MP, Ricciardi RP. 1984. BK virus-plasmid expression vector that persists episomally in human cells and shuttles into *Escherichia coli*. *Mol Cell Biol* 4: 1551-1560.
- [159] DiMaio D, Treisman R, Maniatis T. 1982. Bovine papillomavirus vector that propagates as a plasmid in both mouse and bacterial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 4030-4034.
- [160] Law MF, Lowy DR, Dvoretzky I, Howley PM. 1981. Mouse cells transformed by bovine papillomavirus contain only extrachromosomal viral DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 2727-2731.
- [161] Ustav M, Stenlund A. 1991. Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *EMBO J* 10: 449-457.
- [162] Lindahl T, Adams A, Bjursell G, Bornkamm GW, Kaschka-Dierich C, Jehn U. 1976. Covalently closed circular duplex DNA of Epstein-Barr virus in a human lymphoid cell line. *J Mol Biol* 102: 511-530.
- [163] Yates J, Warren N, Reisman D, Sugden B. 1984. A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 3806-3810.
- [164] Yates JL, Warren N, Sugden B. 1985. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* 313: 812-815.
- [165] Rawlins DR, Milman G, Hayward SD, Hayward GS. 1985. Sequence-specific DNA binding of the Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA-1) to clustered sites in the plasmid maintenance region. *Cell* 42: 859-868.
- [166] Stinchcomb DT, Struhl K, Davis RW. 1979. Isolation and characterisation of a yeast chromosomal replicator. *Nature* 282: 39-43.
- [167] Murray AW, Szostak JW. 1983. Construction of artificial chromosomes in yeast. *Nature* 305: 189-193.
- [168] Tyler-Smith C, Willard HF. 1993. Mammalian chromosome structure. *Curr Opin Genet Dev* 3: 390-397.
- [169] Wilkie AO, Lamb J, Harris PC, Finney RD, Higgs DR. 1990. A truncated human chromosome 16 associated with alpha thalassaemia is stabilized by addition of telomeric repeat (TTAGGG)<sub>n</sub>. *Nature* 346: 868-871.
- [170] Harrington JJ, van Bokkelen G, Mays RW, Gustashaw K, Willard HF. 1997. Formation of de novo centromeres and construction of first-generation human artificial microchromosomes. *Nat Genet* 15: 345-355.

- 
- [171] Farr CJ, Stevanovic M, Thomson EJ, Goodfellow PN, Cooke HJ. 1992. Telomere-associated chromosome fragmentation: applications in genome manipulation and analysis. *Nat Genet* 2: 275-282.
- [172] Heller R, Brown E, Burgtorf C, Brown WRA. 1996. Mini-chromosomes derived from human Y-chromosome by telomere directed chromosome breakage. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 7125-7130.
- [173] Ikeno M, Grimes B, Okazaki T, Nakano M, Saitoh K, Hoshino H, McGill NI, Cooke H, Masumoto H. 1998. Construction of YAC-based mammalian artificial chromosomes. *Nat Biotechnol* 16: 431-439.
- [174] Piechaczek C, Fetzner C, Baiker A, Bode J, Lipps HJ. 1999. A vector based on the SV40 origin of replication and chromosomal S/MARs replicates episomally in CHO cells. *Nucleic Acids Res* 27: 426-428.
- [175] Vogelstein B, Pardoll DM, Coffey DS. 1980. Supercoiled loops and eukaryotic DNA replicaton. *Cell* 22: 79-85.
- [176] Brylawski BP, Tsongalis GJ, Cordeiro-Stone M, May WT, Comeau LD, Kaufman DG. 1993. Association of putative origins of replication with the nuclear matrix in normal human fibroblasts. *Cancer Res* 53: 3865-3868.
- [177] Jenke BHC, Fetzner CP, Stehle IM, Jonsson F, Fackelmayer FO, Conradt H, Bode J, Lipps HJ. 2002. An episomally replicating vector binds to the nuclear matrix protein SAF-A in vivo. *EMBO Rep* 3: 349-354.
- [178] Baiker A, Maercker C, Piechaczek C, Schmidt SBA, Bode J, Benham C, Lipps HJ. 2000. Mitotic stability of an episomal vector containing a human scaffold/matrix attached region is provided by association with nuclear matrix. *Nat Cell Biol* 2: 182-184.
- [179] Jenke ACW, Stehle IM, Herrmann F, Eisenberger T, Baiker A, Bode J, Fackelmayer FO, Lipps HJ. 2004. Nuclear scaffold/matrix attached region modules linked to a transcription unit are sufficient for replication and maintenance of a mammalian episome. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 11322-11327.
- [180] Schaarschmidt D, Baltin J, Stehle IM, Lipps HJ, Knippers R. 2004. An episomal mammalian replicon: sequence-independent binding of the origin recognition complex. *EMBO J* 23: 191-201.
- [181] Stehle IM, Scinteie MF, Baiker A, Jenke AC, Lipps HJ. 2003. Exploiting a minimal system to study the epigenetic control of DNA replication: the interplay between transcription and replication. *Chromosome Res* 11: 413-421.

- 
- [182] Nehlsen K, Broll S, Bode J. 2006. Replicating minicircles: Generation of nonviral episomes for the efficient modification of dividing cells. *Gene Ther Mol Biol* 10: 233-244.
- [183] Papapetrou EP, Ziros PG, Micheva ID, Zoumbos NC, Athanassiadou A. 2005. Gene transfer into human hemapoietic progenitor cells with an episomal vector carrying an S/MAR element. *Gene Ther* 13(1): 40-51.
- [184] Chen ZY, Riu E, He CY, Xu H, Kay MA. 2008. Silencing of episomal transgene expression in liver by plasmid bacterial backbone DNA is independent of CpG methylation. *Mol Ther* 16: 548-556.
- [185] Yew NS, Zhao H, Przybylska M, Wu IH, Tousignant JD, Scheule RK, Cheng SH. 2002. CpG-depleted plasmid DNA vectors with enhanced safety and long-term expression in vivo. *Mol Ther* 5: 731-738.
- [186] Bigger BW, Tolmachov O, Collombet JM, Fragkos M, Palaszewski I, Coutelle C. 2001. An araC-controlled bacterial cre expression system to produce DNA minicircle vectors for nuclear and mitochondrial gene therapy. *J Biol Chem* 276: 23018-23027.
- [187] Chen ZY, He CY, Ehrhardt A, Kay MA. 2003. Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA results in persistent and high-level transgene expression in vivo. *Mol Ther* 8: 495-500.
- [188] Argyros O, Wong SP, Fedonidis C, Tolmachov O, Waddington SN, Howe SJ, Niceta M, Coutelle C, Harbottle RP. 2011. Development of S/MAR minicircles for enhanced and persistent transgene expression in the mouse liver. *J Mol Med* 89: 515-529.
- [189] Harraghy N, Gaussin A, Mermod N. 2008. Sustained transgene expression using MAR elements. *Curr Gene Ther* 8: 353-366.
- [190] Stenler S, Andersson A, Simonson OE, Lundin KE, Chen ZY, Kay MA, Smith CIE, Sylvén C, Blomberg P. 2009. Gene transfer to mouse heart and skeletal muscles using a minicircle expressing human vascular endothelial growth factor. *J Cardiovasc Pharmacology* 53: 18-23.
- [191] Mayrhofer P, Blaesens M, Schleef M, Jechlinger W. 2008. Minicircle-DNA production by site specific recombination and protein-DNA interaction chromatography. *J Gene Med* 10: 1253-1269.
- [192] Helenius A, Marquardt T, Braakman I. 1992. The endoplasmic reticulum as a protein-folding compartment. *Trends Cell Biol* 2: 227-231.
- [193] Ellgaard L, Helenius A. 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 181-191.

- 
- [194] Christis C, Lubsen NH, Braakman I. 2008. Protein folding includes oligomerization: examples from the endoplasmic reticulum and cytosol. *FEBS J* 275: 4700–4727.
- [195] Huber R, Deisenhofer J, Colman PM, Matsushima M, Palm W. 1976. Crystallographic structure studies of an IgG molecule and an Fc fragment. *Nature* 264: 415–420.
- [196] Amzel LM, Poljak RJ. 1979. 3-Dimensional structure of immunoglobulins. *Annu Rev Biochem* 48: 961–997.
- [197] Goto Y, Hamaguchi K. 1979. Role of the intrachain disulfide bond in the conformation and stability of the constant fragment of the immunoglobulin light chain. *J. Biochem (Tokyo)* 86: 1433–1441.
- [198] Porter RR. 1973. Structural studies of immunoglobulins. *Science* 180: 713–716.
- [199] Coffino P, Laskov R, Scharff MD. 1970. Immunoglobulin production: method for quantitatively detecting variant myeloma cells. *Science* 167: 186–188.
- [200] Melchers F. 1971. The secretion of a Bence-Jones type light chain from a mouse plasmacytoma. *Eur J Immunol* 1: 330–335.
- [201] Bole DG, Hendershot LM, Kearney JF. 1986. Posttranslational association of immunoglobulin heavy-chain binding-protein with nascent heavy-chains in nonsecreting and secreting hybridomas. *J Cell Biol.* 102: 1558–1566.
- [202] Hendershot L, Bole D, Kohler G, Kearney JF. 1987. Assembly and secretion of heavy-chains that do not associate posttranslationally with immunoglobulin heavy-chain binding-protein. *J Cell Biol* 104: 761–767.
- [203] Kaloff CR, Haas IG. 1995. Coordination of immunoglobulin chain folding and immunoglobulin chain assembly is essential for the formation of functional IgG. *Immunity* 2: 629–637.
- [204] Vanhove M, Usherwood YK, Hendershot LM. 2001. Unassembled Ig heavy chains do not cycle from BiP in vivo but require light chains to trigger their release. *Immunity* 15: 105–114.
- [205] Feige MJ, Groscurth S, Marcinowski M, Shimizu Y, Kessler H, Hendershot LM, Buchner J. 2009. An unfolded CH1 domain controls the assembly and secretion of IgG antibodies. *Mol Cell* 34(5): 569–579.
- [206] Walsh G. 2003. Biopharmaceutical benchmarks-2003. *Nat Biotechnol* 21: 865–870.
- [207] Reichert J M. 2001. Monoclonal antibodies in the clinic. *Nat Biotechnol* 19: 819–822.
- [208] Chen K, Liu Q, Xie L, Sharp PA, Wang DI. 2001. Engineering of a mammalian cell line for reduction of lactate formation and high monoclonal antibody production. *Biotechnol Bioeng* 72: 55–61.

- 
- [209] Bianchi AA, McGrew JT. 2003. High-level expression of full length antibodies using trans-complementing expression vectors. *Biotechnol Bioeng* 84: 439-444.
- [210] Schlatter S, Stansfield SH, Dinnis DM, Racher AJ, Birch JR, James DC. 2005. On the optimal ratio of heavy to light chain genes for efficient recombinant antibody production by CHO cells. *Biotechnol Prog* 21: 122-133.
- [211] Jandt U, Shao S, Wirth M, Zeng AP. 2011. Spatiotemporal modeling and analysis of transient gene delivery. *Biotech Bioeng* 108: 2205-2217.
- [212] Nehlsen K, Broll S, Kandimalla R, Heinz N, Heine M, Binius S, Schambach A, Bode J. 2011. Replicating Minicircles: Overcoming the Limitations of Transient and of Stable Expression Systems In "Minicircle and Plasmid DNA Vectors - The Future of non-viral and viral Gene-Transfer", Schleef (ed.) Wiley-VCH Verlag. In press.
- [213] Conter A. 2003. Plasmid DNA supercoiling and survival in long-term cultures of *Escherichia coli*: Role of NaCl. *J Bacteriol* 185: 5324-5327.
- [214] Oumard A, Qiao J, Jostock T, Li T & Bode J. (2006) Recommended Method for Chromosome Exploitation: RMCE-based cassette-exchange systems in animal cell biotechnology. *Cytotechnology* 50:93–108.
- [215] Bole DG, Hendershot LM, Kearney JF. 1986. Posttranslational association of immunoglobulin heavy-chain binding-protein with nascent heavy-chains in nonsecreting and secreting hybridomas. *J Cell Biol* 102: 1558–1566.
- [216] Coffino P, Laskov R, Scharff MD. 1970. Immunoglobulin production: method for quantitatively detecting variant myeloma cells. *Science* 167: 186–188.
- [217] Melchers F. 1971. The secretion of a Bence-Jones type light chain from a mouse plasmacytoma. *Eur J Immunol* 1: 330–335.
- [218] Wulff BS, O'Hare MM, Boel E, Theill LE, Schwartz TW. 1990. Partial processing of the neuropeptide Y precursor in transfected CHO cells. *FEBS* 261: 101-105.
- [219] Byun HM, Suh D, Jeong Y, Wee HS, Kim JM, Kim WK, Ko JJ, Kim JS, Lee YB, Oh YK. 2005. Plasmid vectors harboring cellular promoters can induce prolonged gene expression in hematopoietic and mesenchymal progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 332: 518-523.
- [220] Mauksch C. 2008. Untersuchungen zum nichtviralen Gentransfer mittels integrierender und extrachromosomal-replikationskompetenter Plasmid-DNA in hämatopoetischen Zellen. Dissertation FU Berlin.
- [221] Caponigro G, Parker R. 1996. Mechanisms and control of mRNA turnover in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 60: 233–249.

- 
- [222] Gross G, Hauser H. 1995. Heterologous expression as a tool for gene identification and analysis. *J Biotechnol* 41: 91–110.
- [223] McCarthy JEG. 1998. Posttranscriptional control of gene expression in yeast. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 1492–1553.
- [224] Kaufman WL, Kocman I, Agrawal V, Rahn HP, Besser D, Gossen M. 2008. Homogeneity and persistence of transgene expression by omitting antibiotic selection in cell line isolation. *Nucl Acid Res* 36 (17): e111.
- [225] Freimark D, Jèrôme V, Freitag R. 2010. A GFP-based method facilitates clonal selection of transfected CHO cells. *Biotechnol J* 5(1): 24–31.
- [226] Brezinsky SC, Chiang GG, Szilvasi A, Mohan S, Shapiro RI, MacLean A, Sisk W, Thill G. 2003. A simple method for enriching populations of transfected CHO cells for cells of higher specific productivity. *J Immunol Meth* 277: 141–155.
- [227] Gorman C, Bullock C. 2000. Site-specific gene targeting for gene expression in eukaryotes. *Curr Opin Biotechnol* 11: 455–460.
- [228] Chen C, Okayama H. 1987. High-Efficiency Transformation of Mammalian Cells by Plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 7(8): 2745–2752.
- [229] Chen C, Chasin LA. 1998. Cointegration of DNA molecules introduced into mammalian cells by electroporation. *Somat Cell Mol Genet* 24: 249–56.
- [230] Bacsi SG, Wejksnora PJ. 1986. Effect of increase in ploidy on the activation of nucleolar organizer regions in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Exp Cell Res* 165: 283–289.
- [231] Flintoff WF, Livingston E, Duff C, Worton RG. 1984. Moderate-level gene amplification in methotrexate-resistant Chinese hamster ovary cells is accompanied by chromosomal translocations at or near the site of amplified DHFR gene. *Mol Cell Biol* 4: 69–76.
- [232] Yoshikawa T, Nakanishi F, Ogura Y, Oi D, Omasa T, Katakura Y, Kishimoto M, Suga K. 2000. Amplified gene location in chromosomal DNA affected recombinant protein production and stability of amplified genes. *Biotechnol Progr* 16: 710–715.
- [233] Kim NS, Kim SJ, Lee GM. 1998. Clonal variability within dihydrofolate reductase-mediated gene amplified Chinese hamster ovary cells: Stability in the absence of selective pressure. *Biotechnol Bioeng* 60: 679–688.
- [234] Hammill L, Welles J, Carson GR. 2000. The gel microdrop secretion assay: Identification of a low productivity subpopulation arising during the production of human antibody in CHO cells. *Cytotechnology* 34: 27–37.

- 
- [235] Cossons NH, Hayter PM, Tuite MF, Jenkins N. 1991. Stability of amplified DNA in Chinese hamster ovary cells. In: Spider JB, Meigner B, editors. Production of biologicals from animal cells in culture. Oxford: Butterworth-Heinemann. 309.
- [236] Riggs MG, Whittaker RG, Neumann JR, Ingram VM. 1977. n-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells. *Nature* 268: 462-464.
- [237] Wulhfard S, Baldi L, Hacker DL, Wurm F. 2010. Valproic acid enhances recombinant mRNA and protein levels in transiently transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biotechnol* 148: 128-132.
- [238] Kruh J. 1982. Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. *Mol Cell Biochem* 42: 65-82.
- [239] Utley RT, Ilkeda K, Grant PA, Cote J, Steger DJ, Eberharter A, John S, Workman JL. 1998. Transcriptional activators direct histone acetyl complexes to nucleosomes. *Nature* 394: 498-502.
- [240] Broday L, Lee YW, Costa M. 1999. 5-Azacytidine induces transgene silencing by DNA Methylation in chinese hamster cells. *Mol Cell Biol* 19 (4): 3198-3204.
- [241] Nehlsen K. 2004. Molekulare Grundlagen der episomalen Replikation: Charakterisierung zirkulärer, nichtviraler Vektoren. Dissertation TU Braunschweig.
- [242] Wade-Martins R, Frampton J, James MR. 1999. Long-term stability of large insert genomic DNA episomal shuttle vectors in human cells. *Nucl Acids Res* 27: 1674-1682.
- [243] Kozak M. 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucl Ac Res* 15: 8125-8148.
- [244] Pain VM. 1996. Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *Eur J Biochem* 236: 747-771.
- [245] Kochetov AV, Ischenko IV, Vorobiev DG, Kel AE, Babenko VN, Kisselev LL, Kolchanov NA. 1998. Eukaryotic mRNAs encoding abundant and scarce proteins are statistically dissimilar in many structural features. *FEBS Lett* 440: 351-355.
- [246] Kozak M. 1991. A short leader sequence impairs the fidelity of initiation by eukaryotic ribosomes. *Gene Express* 1: 111-115.
- [247] Kozak M. 1994. Determinants of translation fidelity and efficiency in vertebrate mRNAs, *Biochimie* 76: 815-821.
- [248] Geballe AP, Morris DDR. 1994. Initiation codons within 5'-leaders of mRNAs as regulators of translation. *Trends Biochem Sci* 19: 159-164.



- 
- [249] Kozak M. 2000. Do the 5' untranslated domains of human cDNAs challenge the rules for initiation of translation (or is it vice versa)? *Genomics* 70: 396-406.
- [250] Rogozin IB, Kochetov AV, Kondrashov FA, Koonin EV, Milanesi L. 2001. Presence of ATG triplets in 5' untranslated regions of eukaryotic cDNAs correlates with a 'weak' context of the start codon. *Bioinformatics* 17: 890-900.
- [251] Wulff BS, O'Hare MM, Boel E, Theill LE, Schwartz TW. 1990. Partial processing of the neuropeptide Y precursor in transfected CHO cells. *FEBS* 261: 101-105.
- [252] Byun HM, Suh D, Jeong Y, Wee HS, Kim JM, Kim WK, Ko JJ, Kim JS, Lee YB, Oh YK. 2005. Plasmid vectors harboring cellular promoters can induce prolonged gene expression in hematopoietic and mesenchymal progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 332: 518-523.
- [253] Riu E, Chen ZY, Xu H, He CY, Kay MA. 2007. Histone modifications are associated with the persistence or silencing of vector-mediated transgene expression in vivo. *Mol Ther* 15: 1348-55.
- [254] Giannakopoulos A, Stavrou EF, Zarkadis I, Zoumbos N, Thrasher AJ, Athanassiadou A. 2009. The functional role of S/MARs in episomal vectors as defined by the stress-induced destabilization profile of the vector sequences. *J Mol Biol* 387: 1239-1249.
- [255] Pikaart MJ, Recillas-Targa F, Felsenfeld G. 1998. Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators. *Genes Dev* 12: 2852-2862.
- [256] Li Q, Harju S, Peterson KR. 1999. Locus control regions coming of age at a decade plus. *Trends Genet* 15: 403-408.
- [257] Needham M, Gooding C, Hudson K, Antoniou M, Grosveld F, Hollis M. 1992. LCR/MEL: A versatile system for high-level expression of heterologous proteins in erythroid cells. *Nucl Ac Res* 20: 997-1003.
- [258] Mulcahy T. 2001. The use of chromatin-remodelling elements to achieve rapid high-level gene expression. *Proceedings of the ESACT-UK Conference, Cambridge, UK.*
- [259] Reid LH, Shesely EG, Kim HS, Smithies O. 1991. Cotransformation and gene targeting in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 11: 2769-2777.
- [260] Smith K. 2001. Theoretical mechanisms in targeted and random integration of transgene DNA. *Reprod.Nutr.Dev.* 41: 465-485.
- [261] Smith LM, Willmore E, Austin CA, Curtin NJ. 2005. The novel poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor, AG14361, sensitizes cells to topoisomerase I poisons by increasing the persistence of DNA strand breaks. *Clin Cancer Res* 11 (23): 8449-8457.

- 
- [262] Delaney CA, Wang LZ, Kyle S, White AW, Calvert AH, Curtin NJ, Durkacz BW, Hostomsky Z, Newell DR. 2000. Potentiation of temozolomide and topotecan growth inhibition and cytotoxicity by novel poly(ADP-ribose)polymerase inhibitors in a panel of human tumour cell lines. *Clin Cancer Res* 6: 2860-2867.
- [263] Miknyoczki SJ, Jones-Bolin S, Pritchard S, Hunter K, Zhao H, Wan W, Ator M, Bihovsky R, Hudkins R, Chatterjee S, Klein-Szanto A, Dionne C, Ruggeri B. 2003. Chemopotential of temozolomide, irinotecan and cisplatin activity by CEP-6800, a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor. *Mol Cancer Ther* 2: 371-382.
- [264] Losada R, Rivero MT, Slijepcevic P, Goyanes V, Fernández JL. 2005. Effect of Wortmannin on the repair profiles of DNA double-strand breaks in the whole genome and in interstitial telomeric sequences of chinese hamster cells. *Mutation Res* 570: 119-128.
- [265] Nutley BP, Smith NF, Hayes A, Kelland LR, Brunton L, Golding BT, Smith GCM, Martin NMB, Workman P, Raynaud FI. 2005. Preclinical pharmacokinetics and metabolism of a novel prototype DNA-PK inhibitor NU7026. *Brit J Cancer* 93: 1011-1018.
- [266] Lynn S, Lai HT, Kao SM, Lai J, Jan KY. 1997. Cadmium inhibits DNA strand break rejoining in methyl methanesulfonate-treated CHO-K1 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 144: 171-176.
- [267] Bohm L, Roos WP, Serafin AM. 2003. Inhibition of DNA repair by Pentoxifylline and related methylxanthine derivatives. *Toxicology* 193: 153-160.
- [268] Bohm L, Theron T, Binder A. 2000. Influence of Pentoxifylline, A-802710, propentofylline and A-802715 (Hoechst) on the expression of cell cycle blocks and S-phase content after irradiation damage. *Biochim Biophys Acta* 1499: 1-10.
- [269] Assaad NA, Zeng Z, Guan J, Thacke J, Iliakis G. 2000. Homologous recombination as a potential target for caffeine radiosensitisation in mammalian cells reduced caffeine radiosensitisation in XRSS2 and XRSCC 3 mutants. *Oncogene* 129: 5788-5800.
- [270] Wang X, Wang H, Iliakis G, Wang Y. 2003. Caffeine induced radiosensitisation is independent of non-homologous end joining of DNA double strand breaks. *Radiat Res* 159: 426-432.
- [271] Bohm L. 2006. Inhibition of homologous recombination repair with Pentoxifylline targets G2 cells generated by radiotherapy and induces major enhancements of the toxicity of cisplatin and melphalan given after irradiation. *Radiat Oncol* 1: 12.

- 
- [272] Hakimi P, Yang J, Casadesus G, Massillon D, Tolentino-Silva F, Nye CK, Cabrera ME, Hagen DR, Utter CB, Baghdy Y, Johnson DH, Wilson DL, Kirwan JP, Kalhan SC, Hanson RW. 2007. Overexpression of the Cytosolic Form of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (GTP) in Skeletal Muscle Repatterns Energy Metabolism in the Mouse. *J Biol Chem* 282 (45): 32844–32855.
- [273] Kim SH, Lee GM. 2007. Functional expression of human pyruvate carboxylase for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells (DG44). *Appl Microbiol Biotech* 76 (3): 659-665.
- [274] Lucas BK, Giere LM, DeMarco RA, Shen A, Chisholm V, Crowley CW. 1996. High-level production of recombinant proteins in CHO cells using a dicistronic DHFR intron expression vector. *Nucl Ac Res* 24 (9): 1774–1779.
- [275] Blochberger TC, Cooper C, Peretz D, Tatzelt J, Griffith OH, Baldwin MA, Prusiner SB. 1997. Prion protein expression in Chinese hamster ovary cells using a glutamine synthetase selection and amplification system. *Protein Engineering* 10 (12): 1465–1473.
- [276] Hernández-Montalvo V, Valle F, Bolivar F, Gosset G. 2001. Characterization of sugar mixtures utilization by an *Escherichia coli* mutant devoid of the phosphotransferase system, *Appl Microbiol Biotechnol* 57: 186-191.
- [277] Mayrhofer P, Blaesén M, Schleef M, Jechlinger W. 2008. Minicircle-DNA production by site specific recombination and protein–DNA interaction chromatography. *J Gene Med* 10: 1253–1269.
- [278] Sousa F, Matos T, Prazeres DM, Queiroz JA. 2008. Specific recognition of supercoiled plasmid DNA in arginine affinity chromatography. *Analyt Biochem* 374: 432-434.
- [279] Sousa F, Freitas S, Azzoni AR, Prazeres DM, Queiroz J. 2006. Selective purification of supercoiled plasmid DNA from clarified cell lysates with a single histidine-agarose chromatography step. *Biotechnol Appl Biochem* 45: 131-40.
- [280] Sousa A, Sousa F, Queiroz JA. 2009. Biorecognition of supercoiled plasmid DNA isoform in lysine-affinity chromatography. *J Chromatogr B* 877: 3257–3260.
- [281] Hsieh TS, Capp C. 2005. Nucleotide- and stoichiometry-dependent DNA supercoiling by reverse gyrase. *J Biol Chem* 280: 20467-20475.
- [282] Darquet AM, Cameron B, Wils P, Scherman D, Crouzet J. 1997. A new DNA vehicle for nonviral gene delivery: supercoiled minicircle. *Gene Ther* 4: 1341 – 1349.

- 
- [283] Richmond TJ, Finch JT, Rushton B, Rhodes D, Klug A. 1984. Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature* 311: 532-537.
- [284] Ayoubi TA, Meulemans SM, Roebroek AJ, Van de Ven WJ. 1996. Production of recombinant proteins in chinese hamster ovary cells overexpressing the subtilisin-like proprotein converting enzyme furin. *Mol Biol Rep* 23: 87-95.
- [285] Liebich I, Bode J, Frisch M, Wingender E. 2002. S/MARt DB: A database on scaffold/matrix attached regions. *Nucl Acids Res* 30: 312-374.
- [286] Binius S. 2011. Minicircles als funktionelle Werkzeuge zur Erweiterung der transienten Genexpression in Säugerzelllinien. Dissertation TU Braunschweig
- [287] Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- [288] Ramirez-Solis R, Liu P, Bradley A. 1995. Chromosome engineering in mice. *Nature* 378: 720-724.
- [289] Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.
- [290] Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira, Baltimore D, Darnell JE. 2001. *Molekulare Zellbiologie*. Spektrum Akademischer Verlag.
- [291] Bertschinger M, Schertenleib A, Cevey J, Hacker DL, Wurm FM. 2008. The kinetics of polyethylenimine-mediated transfection in suspension cultures of chinese hamster ovary cells. *Mol Biotechnol* 40: 136-143.
- [292] Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP. 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine. *Biochemistry* 92: 7297-7301.
- [293] Grosse S, Thévenot G, Monsigny M, Fajac I. 2006. Which mechanism for nuclear import of plasmid DNA complexed with polyethylenimine derivatives. *J Gene Med* 8: 845-851.
- [294] Thomas M, Klibanov AM. 2003. Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery. *Appl Microbiol Biotechnol* 62: 27-34.
- [295] De los Milagros Bassani Molinas, M. 2005. Transient transfection of HEK293 cells in suspension: Process characterization and optimization by applying invasive nucleotide and non-invasive electronic nose technology. Dissertation TU Braunschweig.
- [296] Engvall E, Perlman, P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochem* 8: 871-874.

- 
- [297] Andrews BJ, Proteau GA, Beatty LG, Sadowski PD. 1985. The FLP recombinase of the 2 micron circle DNA of yeast: interaction with its target sequences. *Cell* 40: 795-803.
- [298] Buchholz F, Angrand PO, Stewart AF. 1996. A simple assay to determine the functionality of Cre or FLP recombination targets in genomic manipulation constructs. *Nucl Ac Res* 24: 3118-3119.
- [299] Lee EC, Yu D, Martinez de Velasco J, Tessarollo L, Swing DA, Court DL, Jenkins NA, Copeland NG. 2001. A highly efficient *Echerichia coli*-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics* 73: 56-65.
- [300] Rehberger B, Heine M, Wodarczyk C, Wagner R. 2010. Verfahren zur semi-synthetischen Herstellung hochreiner Minicircle DNA-Vektoren aus Plasmiden. Patent EP10186568.1.

## **8. Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe Epigenetische Regulationsmechanismen des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung, Braunschweig und in der Abteilung DE TEC PEX der Rentschler Biotechnologie GmbH angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jürgen Bode für die Bereitstellung des Themas und für die stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Stefan Dübel danke ich für das Koreferat und dafür, dass er zusammen mit Herrn Prof. Dr. Jürgen Bode die Arbeit vor der Fakultät für Lebenswissenschaften der Technischen Universität Braunschweig vertritt. Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Norbert Käufer für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Bei der Rentschler Biotechnologie GmbH möchte ich mich für die finanzielle Förderung meiner gesamten Arbeit bedanken.

Besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Roland Wagner, PD Dr. Dethard Müller, Dr. Manfred Wirth, Dr. Claas Wodarczyk und Bernd Rehberger für die freundliche und engagierte Betreuung dieser Arbeit und für die daraus resultierenden zahlreichen fachlichen Diskussionen, Ratschläge und Hilfestellungen bedanken.

Für viele praktische Tipps und die vielen aufbauenden Worte danke ich Dr. André Oumard. Mein Dank gilt zudem allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des Bereichs Molekulare Biotechnologie (HZI) und der Abteilung DE TEC PEX und DE PEX (Rentschler Biotechnologie), insbesondere Stefanie Binius, Sandra Broll, Maren Freund, Maria Höxter, Astrid Hans, Martina Grashoff, Janet Köhler, Britta Reichenbächer, Caroline Hauser, Kathrin Wicke, Renee Weber, Antje Rößner und Katrin Fischer für die alltäglichen Diskussionen, die fachliche und persönliche Unterstützung sowie die vielen interessanten Gespräche.

Mein größter Dank gilt natürlich meiner Freundin Ilka, die mit mir alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit und des Alltags durchgestanden hat und mir immer wieder Mut zum Durchhalten gemacht hat.

Bedanken möchte ich mich außerdem in besonderem Maße bei meiner Familie und Ilkas Familie für die Unterstützung während dieser Arbeit und dafür, dass sie mir gezeigt haben, dass es ein Leben außerhalb der Promotion gibt.